

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Departamento de Sanidad Animal**



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización inmunoproteómica de derivados proteicos de  
"Mycobacterium bovis, Mycobacterium avium (subespecies  
avium y paratuberculosis) y Corinebacterium  
pseudotuberculosis"**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**José Antonio Infantes Lorenzo**

**Directores**

**Lucas Domínguez Rodríguez**  
**Mercedes Domínguez Rodríguez**  
**Inmaculada Moreno Iruela**

**Madrid**  
**Ed. electrónica 2019**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Sanidad Animal**

**CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA (VISAVET)**

**Servicio Micobacterias**



## **TESIS DOCTORAL**

**Caracterización inmunoproteómica de derivados proteicos de  
*Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* (subespecies *avium* y  
*paratuberculosis*) y *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Aplicación  
diagnóstica**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**José Antonio Infantes Lorenzo**

**Directores:**

**Lucas Domínguez, Mercedes Domínguez e Inmaculada Moreno**

**Madrid, 2018**





FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID**

**D. Lucas Domínguez Rodríguez**, Catedrático del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense Madrid (UCM), **Dña. Mercedes Domínguez Rodríguez**, Directora de la Unidad de Inmunología Microbiana del Instituto de Salud Carlos III y **Dña. Inmaculada Moreno Iruela**, Investigadora contratada de la Unidad,

**CERTIFICAN:**

Que la tesis doctoral que lleva por título “**Caracterización inmunoproteómica de derivados proteicos de *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* (subespecies *avium* y *paratuberculosis*) y *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Aplicación diagnóstica**” ha sido realizada por el licenciado en Veterinaria D. José Antonio Infantes Lorenzo bajo nuestra dirección, y estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al título de Doctor Internacional por la Universidad Complutense.

**Fdo. Lucas Domínguez**

**Fdo. Mercedes Domínguez**

**Fdo. Inmaculada Moreno**



# Agradecimientos



## Agradecimientos

Parece mentira que ya hayan pasado cinco años desde que deje mi querida Córdoba para venir a la desconocida Madrid a comenzar un nuevo proyecto, mi tesis doctoral que concluye después de este tiempo. Como dijo Alfredo Toraño, a quien le doy las gracias por su infinita sabiduría y ser el oráculo del laboratorio, en la ciencia impera el “nosotros” y por ello me gustaría dedicar unas líneas a todas las personas que me han ayudado a que pueda defender finalmente la tesis.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis que me dieran la oportunidad de empezar este proyecto con ellos. A **Lucas Domínguez**, por ser quien confió en mí y el que me introdujo en el mundo de la investigación. A **Mercedes Domínguez**, por tantísimas horas que he pasado con ella y por la paciencia que ha tenido conmigo sobre todo en los momentos de mayor dificultad. Y a **Inmaculada Moreno**, por su infinita generosidad, dispuesta a ayudar en cualquier momento que la necesitara.

Durante estos cinco años, hay muchas instituciones que me han permitido poder llegar hasta aquí. Tengo que agradecer al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por financiarme con un contrato FPU mi tesis doctoral y dar las gracias a la Universidad Complutense, a la Facultad de Veterinaria y más concretamente al Departamento de Sanidad Animal, porque todas las personas que lo forman me han facilitado mucho el papeleo que para mí siempre ha sido un auténtico quebradero de cabeza.

Sin embargo, hay tres instituciones que han sido fundamental en el desarrollo y conclusión de la tesis doctoral: VISAVET, el Instituto de Salud Carlos III y CZ Veterinaria. Me gustaría agradecer al grupo de Inmunología Microbiana del Instituto de Salud Carlos III con quienes empecé en el laboratorio, me introdujeron en todas las técnicas inmunológicas y en los anticuerpos monoclonales y me han aguantado en los momentos de estrés máximo. Muchísimas gracias **Ana, Sole, Andrea y Marta**.

Al servicio de Micobacterias del centro VISAVET, **Javi, Bea y Lucía**, por los consejos en mis primeros artículos científicos que siempre son más difíciles.



A mi compañero de batalla **Alvaro Roy**, por estar conmigo a pie del cañón, por esas salidas al campo y apoyo mutuo en momentos de desesperación. No me olvido de **Carmen y Emmanuel**, que, aunque ya no están fueron muy importantes para mí en mis comienzos. Y a los técnicos **Fran, Tatiana, Cristina y Daniela**, por ayudarme en la preparación de las muestras. Gracias también a **Laura, Laura, David y María**, del servicio de bioseguridad por enseñarme y darme la oportunidad de trabajar en el P3.

Gracias en general a todo el centro VISAVET, los servicios ICM, SAP, ZTA, NED, SEVISEQ, SEVEGAN, SEVEMUR, SEC, GRRHHD, SIC y SUAT. En especial me gustaría agradecer a **Lorena, María, Pilar y Cristina** por ayudarme siempre con una sonrisa a todo el insufrible papeleo, y por supuesto a los informáticos, **Carlos, Edu, Javi y Sergio** por ayudarme con cualquier problema que tuviera con el ordenador, y sobre todo con el diseño final de la tesis. Querría hacer también una mención especial a **José Manuel Sanchez-Vizcaíno** que, aunque nos conocimos tarde me has influenciado muchísimo. Gracias por tus sabios consejos en momentos muy importantes y por transmitirme esas ganas de seguir creciendo y mejorando.

De VISAVET me quedo con los grandes amigos que he hecho y sin los cuales estos años habrían sido muy distintos. Gracias, **Adriana, Alex, Eli, Elvira, Fran, Juanma, Marisa, Pili, Victor, Sonia, Ines, Irene, Alvaro, Diego, Michelle**. Qué habría sido de mí sin los FNS, sin las salidas para desestresarnos incluso improvisadas (Alex, te estaré eternamente agradecido por obligarme, literalmente, a salir aquella noche), o los grandes viajes con vosotros. Solo puedo deciros gracias por todo.

Gracias a CZ Veterinaria por estar siempre dispuesto a proporcionarnos los reactivos que necesitáramos.

He tenido la suerte durante mi tesis de poder colaborar con grandes personas que me han aportado muchísimo tanto a nivel personal como a nivel profesional, y su granito de arena queda reflejado a lo largo de la tesis. Gracias a **Christian y Mari Ángeles** del IREC, porque me habéis enseñado muchísimo; a **Sergio y Mari Carmen** del CNB porque con vosotros di mis primeros pasos en proteómica y tuvisteis la paciencia suficiente conmigo

cuando mis dudas de 5 minutos se convertían en clases magistrales de dos horas; a **Ana Balseiro** de SERIDA, por los ánimos que me has dado y por la energía positiva que me has transmitido; y a **Montse** del laboratorio de proteómica de la UAB por revisarme el artículo de proteómica.

También he tenido la suerte de realizar varias estancias fuera de Madrid a los que tengo que agradecer que me trataran tan bien y me enseñaran tanto. Gracias **Xosé Bustelo, Manuel Fuentes y Nieves Ibarrola** del Centro de Investigación del Cáncer de la USAL por enseñarme prácticamente todo lo que sé de proteómica. I also would like to thanks **Sandrine** and **Dipesh** from APHA for their support during my stay in New Haw and **Javier Salguero** from Surrey University. Javier, a ti te tengo que agradecer más de lo que crees, me hiciste cambiar mi forma de pensar y sin las estancias contigo, más allá de todo lo que aprendí de inmunohistoquímica, me llevo tu manera de pensar y de trabajar.

Durante este tiempo en Madrid he conocido a muchas personas que también han contribuido a mi tesis. Gracias a todos mis compañeros de piso, siempre preocupados de como llevaba la tesis. Gracias **Jesús**, mi primer compañero y amigo en Madrid, por todas esas salidas improvisadas, cervezas cuando encartaban y buenos momentos en el piso para desestresarnos. A **Elena y Stéfano**, por aquellas tardes viendo futbol en casa, aprendí muchísimo de vosotros. A **Victor y Ramón**, muchas gracias por recibirme siempre con esas sonrisas que os caracterizaban.

Por supuesto tengo que agradecer a todos mis amigos que me han apoyado y ayudado durante este duro proceso, tanto a mis amigos de toda la vida como a mis amigos de la carrera que también son para toda la vida. Tengo que hacer mención especial a **Alexis, Cristobal, Rafa, Milito, Fede, Jorge, María y Lidia**. Gracias por esa llamada para ver cómo estaba o como me iba, por venir a Madrid a visitarme (aunque realmente solo fuera de paso porque teníais clases de Máster, un curso o coger un avión). Y muy especialmente gracias **Lidia**, por apoyarme en mi decisión de venir a Madrid y por aguantarme durante la primera mitad de mi tesis.

Y por último, y por ello lo más importante, gracias a mi familia, porque sin vuestro apoyo incondicional estoy seguro que no habría llegado hasta donde he llegado. Aunque no suelo expresar ni lo que siento ni siquiera palabras de agradecimiento, creo que sabéis que os estoy eternamente agradecido. Gracias a mis **tíos, tías, primos, primas y abuelas**, por interesaos por mí, y creer que saldría algún día en la tele por algún gran descubrimiento, en especial a mi tía **María José** por creer que de aquí a unos años recibiré el Premio Nobel de Medicina. Por supuesto a mi **madre**, a mi **padre** y a mis hermanos, **Laura y Alberto**. Aunque no llame con mucha frecuencia o no coja el teléfono sé que sabéis que

A mi nueva familia, **Raquel y Lucía** (y a mi familia gatuna **Cleo y Gus**), gracias por hacer que me encante Madrid, que quiera que sea mi ciudad. Gracias por aguantarme día a día, en mis buenos momentos, pero sobre todo gracias por apoyarme en mis días no tan buenos. Mil veces gracias por tener paciencia conmigo durante la escritura de la tesis, durante la infinita burocracia y por alegrarme y animarme cuando más lo necesitaba. Sin vosotras, mi tiempo en Madrid no habría sido igual y estoy seguro que no habría llegado hasta aquí como lo he hecho.

En definitiva, a todos los que de una u otra forma han contribuido a la realización de esta tesis, muchas gracias.

*"Sin duda no hay progreso"*

Charles Darwin (1809-1882)



# Contenidos



# ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABLAS .....	xi
RESUMEN .....	xiii
SUMMARY .....	xv
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Definición de tuberculosis .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Género Mycobacterium.....</b>	<b>3</b>
1.2.1. Características generales .....	3
1.2.2. Pared celular .....	6
1.2.3. Complejo Mycobacterium tuberculosis.....	7
1.2.4. Complejo Mycobacterium avium.....	8
<b>1.3. Epidemiología .....</b>	<b>9</b>
1.3.1. Tuberculosis en animales.....	9
1.3.2. Tuberculosis en humano de origen animal.....	15
1.3.3. Situación de la tuberculosis en Europa .....	15
1.3.4. Situación de la tuberculosis en España .....	17
<b>1.4. Respuesta inmune frente a la tuberculosis.....</b>	<b>18</b>
1.4.1. Respuesta inmune innata .....	20
1.4.2. Respuesta inmune adaptativa.....	23



## Índice

1.4.3. Citoquinas implicadas.....	27
<b>1.5. Diagnóstico.....</b>	<b>30</b>
1.5.1. Pruebas diagnósticas basadas en la respuesta inmune de base celular .....	30
1.5.2. Pruebas diagnósticas basadas en la respuesta inmune de base humoral.....	34
1.5.3. Derivado proteico purificado.....	34
1.5.4. Concepto de anergia.....	38
<b>1.6. Herramientas disponibles para la descripción de las proteínas inmunogénicas.....</b>	<b>40</b>
1.6.1. Importancia de la proteómica en las enfermedades infecciosas.....	40
1.6.2. Metodología proteómica .....	41
1.6.3. Metodología inmunoproteómica .....	46
<b>2. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS .....</b>	<b>55</b>
<b>3. ESTUDIOS EXPERIMENTALES.....</b>	<b>61</b>
3.1. Capítulo I: Caracterización inmunoproteómica de la PPDb. Análisis de las proteínas responsables de su reactividad cruzada. ....	61
Estudio 1: análisis inmunoproteómico de la PPDb.....	61
1. Materiales y métodos.....	62
1.1. Antígenos .....	62
1.2. Pauta de inmunizaciones empleadas y obtención de hibridomas productores de AcM .....	63
1.3. Inmunoensayos.....	64

1.4. Purificación de los antígenos.....	66
1.5. Identificación de los antígenos mediante MALDI-TOF MS/MS .	67
1.6. Cromatografía líquida de exclusión molecular y análisis mediante dot-blot .....	68
1.7 Resonancia de plasmones superficiales.....	69
<b>2. Resultados y discusión .....</b>	<b>70</b>
2.1. Análisis de la respuesta inmune humoral de ratones frente a la PPDb. Obtención y caracterización de AcMs e identificación de antígenos .....	70
2.2. Análisis de la PPDb y derivados mediante cromatografía de exclusión molecular .....	75
<b>3. Resumen.....</b>	<b>79</b>
<b>Estudio 2: análisis inmunoproteómico de <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>, <i>M.</i> <i>avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> y <i>C. pseudotuberculosis</i> .....</b>	<b>81</b>
<b>1. Materiales y métodos .....</b>	<b>82</b>
1.1. Diseño experimental.....	82
1.2. Antígenos empleados en la obtención de los AcM .....	82
1.3. Inmunoensayos y purificación e identificación de proteínas ..	83
1.4. Citometría de flujo .....	84
1.5. Inmunofluorescencia Indirecta .....	84
<b>2. Resultados .....</b>	<b>85</b>
2.1. Obtención de AcM.....	85
2.2. Citometría de flujo e Inmunofluorescencia.....	90

3. Resumen .....	91
3.2. Capítulo II: caracterización proteómica de la PPDb y PPDa e identificación de antígenos específicos para el serodiagnóstico de la tuberculosis en los animales. ....	93
Estudio 3: caracterización proteómica de la PPDb, PPDa y P22 .....	93
1. Materiales y métodos.....	94
1.1. Antígenos .....	94
1.2. Preparación de la muestra para el análisis proteómico .....	94
1.3. Cromatografía líquida y espectrometría de masas .....	95
1.4. Análisis de datos.....	96
1.5. ELISA indirecto .....	97
2. Resultados y discusión .....	97
2.1. Proteínas presentes en las PPDb, PPDa y en la P22 .....	98
2.2. Análisis cuantitativo y antigénico de las proteínas compartidas .....	101
2.3. Análisis de la respuesta inmune mediada por anticuerpos ..	104
3. Resumen .....	106
3.3. Capítulo III: desarrollo de nuevos ensayos para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. ....	109
Estudio 4: Puesta a punto de los inmunoensayos.....	109
1. Materiales y métodos.....	110
1.1. Muestras .....	110
1.2. Antígenos de tapizado .....	110

1.3. Anticuerpos en IHQ.....	111
1.4 ELISA indirecto .....	111
1.5. Inmunohistoquímica .....	111
<b>2. Resultados y discusión .....</b>	<b>112</b>
2.1. ELISA indirecto frente a los distintos antígenos .....	112
2.2. Inmunohistoquímica .....	115
<b>3. Resumen.....</b>	<b>120</b>
<b>Estudio 5: validación de un ELISA indirecto basado en P22 para el diagnóstico de la tuberculosis en especies domésticas y salvajes .....</b>	<b>121</b>
<b>1. Materiales y métodos .....</b>	<b>122</b>
1.1. Desarrollo del ELISA indirecto basado en el complejo proteico P22 .....	122
1.2. Tratamiento de los datos.....	124
1.3. Análisis estadístico.....	124
1.4. Población de estudio .....	125
<b>2. Resultados y discusión .....</b>	<b>130</b>
2.1. Determinación del punto de corte óptimo .....	130
2.2. Ganado bovino .....	131
2.3. Ganado caprino.....	134
2.4. Ganado ovino .....	135
2.5. Ganado porcino .....	136
2.6. Alpacas y llamas .....	137

## Índice

2.7. Ciervos y jabalíes.....	140
2.8. Tejones.....	140
3. Resumen .....	144
4. DISCUSIÓN GENERAL .....	149
Caracterización inmunoproteómica de PPDb .....	149
Respuesta humoral en animales infectados por MTBC .....	151
5. CONCLUSIONES .....	157
6. CONCLUSIONS.....	161
7. BIBLIOGRAFÍA .....	165
8. ANEXOS.....	201
Anexo I. Listado de reactivos y equipos utilizados. ....	201
Anexo II. Aportaciones científicas derivados del trabajo realizado para la presente tesis doctoral .....	205

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AcM</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribunucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribunucleico
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina ( <i>Bovine serum albumin</i> )
<b>C</b>	Citosina
<b>Da</b>	Dalton
<b>DIVA</b>	<i>Differentiate between Infected and Vaccinated</i>
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DTH</b>	reacción de hipersensibilidad retardada o de tipo IV ( <i>delayed type hypersensitivity</i> )
<b>EFSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i>
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
<b>FBS</b>	Suero bovino fetal ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
<b>G</b>	Guanina
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante ( <i>Horseradish peroxidase</i> )
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>IDTB</b>	Intradermotuberculinización
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina de clase G
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IQR</b>	Rango intercuartil ( <i>Interquartile range</i> )
<b>IU</b>	Unidades internacionales ( <i>International Units</i> )
<b>K<sub>a</sub></b>	Constante de asociación
<b>K<sub>d</sub></b>	Constante de disociación
<b>M/Z</b>	Relación masa/carga
<b>MAC</b>	Complejo <i>Mycobacterium avium</i> ( <i>Mycobacterium avium complex</i> )

## Lista de abreviaturas

<b>MALDI-TOF</b>	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight</i>
<b>MHC</b>	Complejo Principal de Histocompatibilidad
<b>MOTT</b>	<i>mycobacteria other than tuberculosis</i>
<b>MS/MS</b>	Espectrometría de masas en Tándem
<b>MTBC</b>	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ( <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> )
<b>NK</b>	Célula asesina natural (natural killer cell)
<b>NTM</b>	<i>non-tuberculous mycobacteria</i>
<b>OIE</b>	Organización Mundial de la Sanidad Animal ( <i>Office International des Epizooties</i> )
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OTF</b>	Oficialmente libre de tuberculosis ( <i>officially tuberculosis free</i> )
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida ( <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<b>PBS</b>	Solución salina tamponada con fosfato ( <i>phosphate buffered saline</i> )
<b>PBST</b>	PBS suplementado con 0,05% de Tween 20
<b>PPD</b>	Derivado proteico purificado ( <i>purified protein derivative</i> )
<b>RP-HPLC</b>	HPLC en fase reversa
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo celular "Roswell Park Memorial Institute"
<b>SAC</b>	Camélidos de Sudamérica ( <i>South America Camelids</i> )
<b>SDS</b>	dodecilsulfato sódico ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
<b>TNF</b>	factor de necrosis tumoral ( <i>tumor necrosis factor</i> )
<b>WB</b>	<i>Western Blot</i>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 11.** Principales especies domésticas y salvajes implicadas en el mantenimiento de la tuberculosis en Europa.

**Figura 12.** Situación de la tuberculosis bovina en Europa en el año 2016.

**Figura 13.** Perspectiva general de los métodos más utilizados para identificar las dianas de la respuesta inmune humoral.

**Figura 1.1.** Esquema de las fusiones realizadas, pautas de inmunización y antígenos administrados.

**Figura 1.2.** Reactividad de los sueros de los animales seleccionados como donantes de esplenocitos.

**Figura 1.3:** Reactividad por WB de los AcMs seleccionados.

**Figura 1.4:** Reconocimiento mediante dot-blot de las fracciones resultantes tras la filtración por exclusión molecular de la PPDb.

**Figura 1.5:** Cromatograma de la PPDb **(A)**, sobrenadante inactivado de un cultivo de *M. bovis* **(B)** y precipitación con sulfato de amonio de este sobrenadante **(C)**.

**Figura 1.6.** Reactividad por dot-blot con el AcM SIM 377-18 frente a cada una de las fracciones de exclusión molecular de la PPDb tratada con RNasa **(A)**, DNasa **(B)** y alta fuerza iónica **(C)**. **Figura 1.7.** Cromatograma de la PPDb **(A)**, P22 **(B)** y PPDb-F **(C)**.

**Figura 2.1.** Esquema de las fusiones realizadas, pautas de inmunización y antígenos administrados frente a la PPDa.

**Figura 2.2.** Esquema de las fusiones realizadas, pautas de inmunización y antígenos administrados frente a *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

**Figura 2.3.** Esquema de las fusiones realizadas, pautas de inmunización y antígenos administrados frente a *C. pseudotuberculosis*.



## Lista de figuras

**Figura 2.4.** Análisis de la reactividad por citometría de flujo de los AcM frente a *M. avium* subsp. *avium* (A), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (B), *M. bovis* BCG (C) y *C. pseudotuberculosis* (D). Los AcM reconocen MPB70/MPB83 (SIM 377-18), PPE family protein (SIM 390-3 y SIM 390-19), GroEL (SIM 416-23) y Enolasa (SIM 416-27).

**Figura 3.1.** Proteínas identificadas en la PPD<sub>b</sub>, PPD<sub>a</sub> y P22, así como proteínas compartidas entre las preparaciones.

**Figura 3.2.** Reactividad del suero de ratones inmunizados con PPD<sub>a</sub> (A) o PPD<sub>b</sub> (B) mediante ELISA indirecto frente a la PPD<sub>b</sub>, PPD<sub>a</sub> y P22

**Figura 4.1.** Reactividad del suero de 4 cabras infectadas por *M. caprae* frente a distintos antígenos del complejo *M. tuberculosis*.

**Figura 4.2.** Tinción inmunohistoquímica utilizando los distintos AcM sobre tejidos de cabras infectadas experimentalmente por *M. bovis* fijados con formol.

**Figura 5.1.** E% del ELISA indirecto de las distintas especies de las muestras procedentes de Noruega y España

**Figura 5.2.** Histograma del valor de E% de cada animal mediante ELISA indirecto utilizando P22 como antígeno en brotes de *M. bovis* y *M. microti*

**Figura 5.3.** Proporción (%) de animales positivos mediante ELISA indirecto a distintos tiempos post-infección.

**Figura 5.4.** E% del ELISA indirecto para las muestras de tejones infectados de tuberculosis y libres de tuberculosis procedentes de Irlanda.

## LISTA DE TABLAS

**Tabla I1.** Principales especies o variantes de micobacterias de crecimiento lento en Medicina Veerinaria y Salud Pública.

**Tabla I2.** Prevalencia de la tuberculosis bovina a nivel de rebaño en España durante el año 2016.

**Tabla 1.1:** Resumen de las características de las fusiones realizadas, así como de los AcMo finalmente desarrollados.

**Tabla 1.2.** Identificación y características de las proteínas reconocidas por los AcMs tipo.

**Tabla 2.1.** Reactividad por ELISA indirecto de los AcM frente la PPD<sub>b</sub>, PPD<sub>a</sub>, *M. avium* subps. Paratuberculosis (MAP) y *C. pseudotuberculosis* (CP). Los valores de reactividad indicados son: (+++) 20 veces mayor que el control negativo; (++) 10 veces mayor que el control negativo; (+) 3 veces mayor que el control negativo y (-) por debajo de 3 veces el control negativo.

**Tabla 3.1.** Diez proteínas más abundantes identificadas en la PPD<sub>b</sub> (A), PPD<sub>a</sub> (B) y P22 (C).

**Tabla 3.2.** Proteínas compartidas entre la PPD<sub>b</sub>, PPD<sub>a</sub> y P22 que se prevén que pueden contribuir a los fenómenos de reactividad cruzada.

**Tabla 4.1.** Reactividad producida por los AcM anti PPD<sub>b</sub> en tejidos de cabras infectadas experimentalmente con *M. bovis* fijados en formol tamponado al 10% y sometidos a distintos pretratamientos para desenmascarar los antígenos.

**Tabla 5.1.** Anticuerpos secundarios empleados en el ensayo serológico: Dilución, tiempo de incubación, anticuerpo secundario y tiempo de revelado en el ELISA indirecto para cada especie.

**Tabla 5.2.** Número, origen y características de las muestras utilizadas para evaluar la especificidad del ELISA en este estudio.

## *Lista de tablas*

**Tabla 5.3.** Número, origen y características de las muestras de tejones utilizadas en el estudio

**Tabla 5.4.** Sensibilidad (Se), especificidad (Sp) y área bajo la curva (AUC) con el intervalo de confianza al 95% con E%=100 para el ELISA indirecto en distintas especies.

**Tabla 5.5.** Especificidad (Sp) del ELISA indirecto de P22 para cada especie en muestras de Noruega (A) y España (B) evaluadas con dos puntos de corte distintos.

**Tabla 5.6.** Especificidad e intervalo de confianza de Wilson del 95% del ELISA utilizando muestras de suero de llamas y alpacas obtenidas antes y después de la IDTB

**Tabla 5.7.** Sensibilidad e intervalo de confianza del 95% para el ELISA indirecto en llamas y alpacas infectadas de tuberculosis.

**Table 5.8.** Sensibilidad y especificidad del ELISA indirecto en tejones

## RESUMEN

La tuberculosis animal es una zoonosis bacteriana producida por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, especialmente *M. bovis* y *M. caprae* que representa un importante problema sanitario en el hombre y los animales (domésticos y salvajes). Por esta razón, en la Unión Europea, los bovinos están sometidos a un programa de erradicación que se basa en el “diagnóstico y sacrificio” de los animales reaccionantes a las pruebas de diagnóstico oficiales, cuyo reactivo básico es la tuberculina bovina o PPD<sub>b</sub>. Esta es un derivado proteico purificado de *M. bovis* de composición y titulación compleja. Por todo ello nos planteamos el estudio de este reactivo, para a través del conocimiento de la composición de las tuberculinas poder mejorar el diagnóstico.

En primer lugar, llevamos a cabo una caracterización inmunoproteómica utilizando anticuerpos monoclonales (AcM). Obtuvimos 4 AcMo tipo que nos han permitido identificar cinco proteínas inmunodominantes presentes en la PPD<sub>b</sub>: MPB70, MPB83, HspX y ESAT-6, exclusivas del MTBC, y *meromycolate acyl carrier protein* presente también en la PPD<sub>a</sub> (derivado proteico purificado de *M. avium* subsp. *avium*). Las cuatro primeras forman parte de un complejo multiproteico, que se obtiene siempre por inmunopurificación, a partir de la PPD<sub>b</sub>, con el AcM SIM 377-18 el cual reconoce un epítipo común en las proteínas MPB70 y MPB83. A este complejo multiproteico lo denominamos P22, dado que en el análisis por western-blot muestra una proteína mayoritaria con movilidad electroforética a la altura de 22 kDa. Los resultados obtenidos, recogidos en un primer estudio, indican que cuando los ratones son inoculados con la PPD<sub>b</sub> se detecta casi exclusivamente una respuesta serológica de alta intensidad frente a MPB70/83. Esta exclusividad en la respuesta, podría ser debida a su superior concentración en el complejo y a su orientación y posible estructura micelar, que vería favorecido su procesamiento por el sistema inmunitario.

En segundo lugar, para abordar los problemas relacionados con la especificidad, procedimos al estudio de las proteínas compartidas entre *M. bovis*, *M. avium avium*, *M. avium paratuberculosis* y *C. pseudotuberculosis*, mediante la utilización de AcM obtenidos con las bacterias mencionadas o

## Resumen

productos provenientes de ellas. Obtuvimos un total de 21 AcM que reconocen las proteínas comunes: *ModD protein*, *PPE family protein*, *Serine protease*, *Meromycolate acyl carrier protein*, *Diacylglycerol acyltransferase*, GroEL y Enolasa.

Paralelamente a los estudios mencionados y con el objetivo de hacer una aproximación teórica de las proteínas responsables de la reactividad cruzada entre la PPD<sub>b</sub>, PPD<sub>a</sub> y P22, se llevó a cabo un análisis mediante espectrometría de masas. Este estudio nos permitió 1.- Identificar las proteínas constituyentes de las tres preparaciones, así como las proteínas compartidas entre ellas; 2.- Calcular su concentración; 3.- Calcular la antigenicidad en una respuesta humoral; y 4.- Proponer P22 para ser utilizado en ensayos tipo ELISA en la detección de anticuerpos específicos frente a bacterias del complejo *M. tuberculosis*. Desarrollamos y evaluamos nuevos ensayos “multiespecie” para el diagnóstico ante-mortem y post-mortem de la tuberculosis en animales. Como resultados más notables de estos ensayos, hemos comprobado que uno de los anticuerpos, el SIM 377-18, ha mostrando un gran potencial para estudios inmunohistoquímicos en cortes de tejidos procedentes de animales tuberculosos y que P22 es más sensible para la detección de anticuerpos frente a *M. bovis* y *M. caprae* que las proteínas recombinantes MPB70 y MPB83.

Por último, hemos descrito el desarrollo y la validación de un ELISA indirecto basado en el complejo proteico P22 para utilizar en el diagnóstico de tuberculosis en distintas especies domésticas (ganado bovino, caprino, ovino, porcino y llamas y alpacas) y salvajes (ciervos, jabalíes y tejones), obteniendo una sensibilidad entre 63% y 100% y una especificidad entre el 75% y el 100% dependiendo de la especie. Debido a su excelente especificidad en cerdos y camélidos y una especificidad aceptable en ganado bovino, ovejas y tejones, este ELISA puede constituir una buena opción para el diagnóstico de la tuberculosis a nivel de rebaño. Además, se propone el diagnóstico serológico como técnica de vigilancia para detectar anticuerpos específicos frente MTBC, sobre todo en países oficialmente libres de tuberculosis y en animales no sometidos a la prueba de IDTB debido a su alta especificidad en estas condiciones y sus ventajas (simplicidad, bajo costo y requisitos de recursos mínimos).

## SUMMARY

Animal tuberculosis is a zoonotic infection caused by members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC), especially *M. bovis* and *M. caprae*. It represents an important health problem, in humans, domestic animals and wildlife. For this reason, in the European Union, cattle are subject to an eradication programme, based on "test-and-slaughter" strategies, which implies the removal of animals that react positively to diagnostic tests. The official diagnostic tests are based on the cell immune response against the bovine tuberculin or PPD<sub>b</sub>. This is a purified protein derivative (PPD) prepared from *M. bovis* which has a complex composition and needs a careful titration. This is why, in this work, by means of studying the composition of this bovine tuberculin, we considered improving the diagnosis of the tuberculosis disease.

Firstly, we carried out the immunoproteomic characterization of PPD<sub>b</sub> using monoclonal antibodies (mAbs). We obtained four types of mAb that allowed us to identify five immunodominant proteins present in PPD<sub>b</sub>, which are MPB70, MPB83, HspX and ESAT-6 exclusives in MTBC, and *meromycolate acyl carrier protein*, also present in the PPD<sub>a</sub>, the purified protein derivative from *M. avium* subsp. *avium*. The PPD<sub>b</sub> exclusive identified proteins are included in a multiprotein complex which is always obtained by immunopurification from the PPD<sub>b</sub> with the mAb SIM 377-18 and we named P22, because in the western blot analysis shows a major protein with electrophoretic mobility at 22 kDa. This mAb recognizes a common epitope in the MPB70 and MPB83 proteins. The results of this first study also indicate that when mice are inoculated with the PPD<sub>b</sub>, there is a highly exclusive immune response against MPB70/83. The major reactivity against these proteins could be due to their higher concentration in the P22 complex, their orientation and their possible micellar structure, which would benefit their processing by the immune system.

On a second study, we addressed the specificity-related problems by studying the proteins shared between *M. bovis*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* and *C. pseudotuberculosis*, using mAbs obtained with the aforementioned bacteria or their products. We obtained a total of 21 mAbs that recognize the following common proteins: *ModD protein*,

## Summary

*PPE family protein, Serine protease, Meromycolate acyl carrier protein, Diacylglycerol acyltransferase, GroEL and Enolase.*

In addition to the above studies, a mass spectrometry analysis was conducted in order to make a theoretical approximation of the proteins responsible for the cross-reactivity between PPD<sub>b</sub>, PPD<sub>a</sub> and P22 complex. This study allowed us to 1.- Identify the constituent proteins of the three preparations as well as the proteins shared between them; 2.- Calculate the concentration of their constituent proteins; 3.- Calculate their antigenicity in a humoral immunity response; and 4.- Propose the use of the P22 protein complex in ELISA assays, allowing the arrest of specific antibodies against *M. tuberculosis* complex bacteria.

We also developed and evaluated new "multi-species" assays for ante-mortem and post-mortem diagnosis of tuberculosis in animals. As notable results, we found that the mAb SIM 377-18 has a great potential in immunohistochemistry studies testing tissues from TB infected animals, and that the P22 protein complex is more sensitive than the recombinant proteins MPB70 and MPB83 in the detection of antibodies against *M. bovis* and *M. caprae*.

Finally, we have developed and validated an indirect ELISA assay based on the protein complex P22, for the diagnosis of tuberculosis in different domestic animals (cattle, goats, sheep, pigs and llamas and alpaca herds) and wild species (deer, wild boar and badgers). This ELISA has a sensitivity between 63% and 100% and a specificity between 75% and 100%, depending on the species and country studied. Due to its excellent specificity in pigs and camelids, and having an acceptable one in cattle, sheep and badgers, this assay is a good option for the diagnosis of tuberculosis in animal herds. We therefore propose the serological testing as a surveillance technique to detect specific antibodies against the MTBC, especially in countries that are officially free of tuberculosis and animals which are not subject to the intradermal reaction test, showing higher specificities in these conditions. This adds to the existing advantages of these techniques which are simple, low costing and require minimum resources.

# 1. Introducción





# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Definición de tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica causada por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. En muchos países, la tuberculosis es una importante enfermedad infecciosa que puede afectar a varias especies diferentes de animales domésticos y silvestres y también al hombre. En humanos, el principal agente causal es *M. tuberculosis* mientras que en los animales son *M. bovis* y *M. caprae*, ambos con un fuerte carácter zoonótico. La transmisión al ser humano constituye un problema de salud pública. El nombre de la enfermedad se debe a las lesiones que presentan en pulmones y nódulos linfáticos, los llamados granulomas tuberculosos, que recuerdan por su forma a tubérculos.

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas más antiguas de las que se tiene constancia. *M. tuberculosis* se describió por primera vez en 1884 por Robert Koch, en honor al cual a esta bacteria se la conoce como bacilo de Koch. No fue hasta 1970 cuando *M. bovis* se describió como especie responsable de la tuberculosis en el ganado bovino. Actualmente es una enfermedad con un fuerte impacto económico ya que es una enfermedad sometida a programa de erradicación.

En este contexto en el que se persigue la erradicación de la enfermedad, basada en el diagnóstico y sacrificio de los animales positivos, el diagnóstico de los animales infectados se convierte en un objetivo clave.

## 1.2. Género *Mycobacterium*

### 1.2.1. Características generales

Según el Bergey's Manual of Systematic Archaea and bacteria (2015), el género *Mycobacterium* se encuadra de la siguiente manera:

- Dominio: Bacteria
- Phylum: Actinobacteria

## Introducción

- Clase: Actinobacteria
- Orden: Corynebacteriales
- Familia: Mycobacteriaceae

*Mycobacterium* es el único género de la familia Mycobacteriaceae. Actualmente, el género incluye 129 especies y subespecies con nombres válidos publicados (Bergey's Manual of systematic Archaea and Bacteria, 2015), entre las que se encuentran bacterias saprófitas, patógenos oportunistas y patógenos estrictos del hombre y los animales, tanto homeotermos como poiquilotermos, entre ellas patógenos que causan graves enfermedades como son la tuberculosis (incluidas en el MTBC) y la lepra (*M. leprae*).

Las bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium* en general cumplen con las siguientes características: bacilos aerobios obligados, inmóviles, no esporulados (salvo *M. marinum* que se ha descrito recientemente su capacidad para formar esporos (Ghosh et al., 2009), miden de 0,2µm a 0,6µm x 1µm a 10 µm y son bacilos ácido alcohol resistentes, debido a la complejidad de la pared celular que poseen. Filogenéticamente se clasifican como bacterias Gram positivas ya que presentan estructura de éstas, pero desde un punto de vista tintorial se comportan como Gram negativas debido a la composición de su pared celular fuertemente hidrofóbica que impide la penetración del cristal violeta y se tiñen levemente con el mismo. El ADN de las bacterias de este género se caracteriza por su elevado contenido en bases G+C que oscila entre el 61 y el 70%, clasificándolas en el grupo de bacterias Gram positivas con alto contenido en guanina más citosina.

Los avances en las técnicas moleculares hoy en día permiten distinguir el género *Mycobacterium* utilizando técnicas sensibles y rápidas basadas en la amplificación de las secuencias nucleótidos del ácido ribonucleico ribosómico 16S (ARNr 16S) (Boddinghaus et al., 1990; Stahl and Urbance, 1990; Tortoli, 2012). El análisis de esta molécula ha sido la herramienta más utilizada para los estudios taxonómicos de este género (Tortoli, 2012). Según el Bergey's Manual of Systematic Archaeas and Bacteria (2015), las micobacterias se clasifican en dos grupos taxonómicos basados en

la velocidad de crecimiento: aquellas de crecimiento lento (requieren 7 días o más a temperatura óptima para producir colonias visibles) y micobacterias de crecimiento rápido (menos de 7 días de crecimiento en las mismas condiciones). A su vez cada uno de estos dos grupos se dividen en clados basados en el estudio del ARNr 16S. Dentro del grupo de micobacterias de crecimiento lento se incluyen aquellas de mayor importancia en Medicina Veterinaria y Salud Pública, incluido el complejo MTC responsable de la tuberculosis en humanos y animales (Tabla I1).

**Tabla I1.** Principales especies o variantes de micobacterias de crecimiento lento en Medicina Veerinaria y Salud Pública.

<b>Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTBC)</b>	<i>M. tuberculosis</i> (Koch, 1882)
	<i>M. bovis</i> (Karlson and Carr, 1970)
	<i>M. bovis</i> BCG (Grange et al., 1983)
	<i>M. africanum</i> (Castets and Sarrat, 1969)
	<i>M. microti</i> (Reed, 1957)
	<i>M. caprae</i> (Aranaz et al., 2003)
	<i>M. pinnipedi</i> (Cousins et al., 2003)
	<i>M. caneti</i> (van Soolingen et al., 1997)
	<i>Oryx bacillus</i> (Lomme et al., 1976)
<b>Complejo <i>Mycobacterium avium</i> (MAC)</b>	<i>Dassie bacillus</i> (Wagner et al., 1958)
	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> (Thorel et al., 1990)
	<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> (Thorel et al., 1990)
	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (Thorel et al., 1990)
	<i>M. intracellulare</i> (Runyon, 1967)
	<i>M. chimaera</i> (Tortoli et al., 2004)
	<i>M. avium</i> subespecie <i>hominisuis</i> (Mijs et al., 2002)
	<i>M. arosiense</i> (Bang et al., 2008)
	<i>M. colombiense</i> (Murcia et al., 2006)
	<i>M. marseillense</i> (Ben Salah et al., 2009)
	<i>M. bouchedurhonense</i> (Ben Salah et al., 2009)
	<i>M. timonense</i> (Ben Salah et al., 2009)
	<i>M. saskatchewanense</i> (Turenne et al., 2004)

## Introducción

Un estudio reciente en el que emplea secuenciación masiva en el género *Mycobacterium* proponen redefinir las agrupaciones taxonómicas del género empleando para ello la información del genoma completo ya que el ARNr 16S tiene una alta homología intraespecie (que oscila entre 94 y 100%) lo que impide la diferenciación a nivel de especie de micobacterias de taxones estrechamente relacionados (Riojas et al., 2018; Tortoli et al., 2017).

Desde un punto de vista práctico, las micobacterias se clasifican en aquellas difícilmente cultivables (*M. leprae* y *M. lepromurinum*), las que producen tuberculosis en el hombre y los animales (donde se encuadra el complejo *M. tuberculosis*) y el resto de micobacterias, razón por la cual se les llamaron otras micobacterias distintas de tuberculosis (MOTT, mycobacterias other than tuberculosis) o micobacterias no tuberculosas (NTM, Non-tuberculous mycobacterias).

### 1.2.2. Pared celular

Aunque las micobacterias no parecen encajar en la categoría Gram-positiva desde un punto de vista empírico o tintorial (es decir, que no retienen el cristal violeta), se clasifican como bacterias ácido alcohol-resistentes Gram-positivas. Todas las especies del género *Mycobacterium* comparten una característica; una pared celular más gruesa que la de muchas otras bacterias, hidrofóbica, cerosa, y rica en ácidos micólicos/micolatos. El contenido lipídico de las células y la pared celular de las micobacterias es alto (Minnikin and Goodfellow, 1980). La pared de actinomicetos del quimiotipo IV, entre las que se incluyen las micobacterias, tienen ácidos micólicos, que son ácidos grasos de alto peso molecular, cadena larga y con una cadena alifática lateral en la posición 2. Existen ácidos micólicos que no son específicos de las micobacterias y otros ácidos micólicos micobacterianos que difieren entre ellos. Los ácidos micólicos no micobacterianos varían en la longitud de su cadena de 22 a 74 carbonos y en el número de dobles enlaces (0 a 5). Los micolatos micobacterianos tienen entre 60 y 90 átomos de carbono, tienen una gran variedad de tipos estructurales y no tienen más de dos puntos de insaturación (Minnikin and

Goodfellow, 1980). La pared celular rica en lípidos hace que su superficie sea hidrófoba y confiere a las micobacterias resistencia frente a muchos desinfectantes y las tinciones de laboratorio. Esta pared celular proporciona una contribución sustancial a la resistencia de este género de bacterias.

El peptidoglicolípido de la pared celular contiene ácido meso-diaminopimélico, alanina, ácido glutámico, glucosamina, ácido murámico, arabinosa y galactosa (pared quimiotipo tipo IV de (Lechevalier, 1970). Un rasgo característico de las micobacterias y algunos actinomicetos estrechamente relacionados es la resistencia a la decoloración por una mezcla de ácido-alcohol después de una tinción por fucsina básica. Esta propiedad puede estar relacionada con la barrera lipídica de micocil arabinogalactanos que impide la penetración del decolorante. Las variaciones en el contenido lipídico de la pared pueden explicar las diferencias en el grado de resistencia a los ácidos entre las especies de micobacterias.

### 1.2.3. Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Las especies de micobacterias que producen tuberculosis en el hombre y los animales se incluyen en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Este grupo de bacterias se caracterizan por un 99,9% de similitud en la secuencia de nucleótidos e idéntico ARN ribosómico 16S.

Actualmente, las especies incluidas en este complejo son *M. tuberculosis* (Koch, 1882), *M. bovis* (Karlson and Carr, 1970), *M. bovis* BCG (bacilo Calmette-Guérin. (Grange et al., 1983)), *M. africanum* (Castets and Sarrat, 1969), *M. microti* (Reed, 1957), *M. caprae* (Aranaz et al., 2003), *M. pinnipedii* (Cousins et al., 2003), *M. canetti* (van Soolingen et al., 1997). Además, también están incluidas *Oryx bacillus* (Lomme et al., 1976) y *Dassie bacillus* (Wagner et al., 1958). El bacilo *Oryx* ha sido reclasificado recientemente en una subespecie separada, *M. orygis* (Gey van Pittius et al., 2012). Además, dos nuevas especies, *M. suricattae* y *M. mungi*, han sido

## Introducción

propuestas para incluirlas dentro del MTBC (Alexander et al., 2010; Dippenaar et al., 2015).

La división de especies de este grupo sigue criterios epidemiológicos ya que se basa principalmente en la preferencia de hospedador. Ya en 1982 se sugirió que las especies aceptadas dentro del MTBC podrían representar una sola especie (Wayne, 1982) con grupos adaptados al hospedador acorde al concepto de ecotipo (Cohan, 2002). Sin embargo, para muchos autores las diferencias de *M. tuberculosis* y *M. bovis* en el crecimiento, las pruebas bioquímicas y la patogenicidad para ciertos hospedadores, junto con la necesidad de distinguir ambas infecciones, son suficientes para diferenciarlas en especies independientes, aunque estrechamente relacionadas (Collins and De Lisle, 1985; Grange, 1996).

Recientemente, estudios basados en NGS (*Next Generation Sequency*) han demostrado que las distintas especies que forman el MTBC están muy próximas entre sí y proponen la sustitución de la nomenclatura utilizada hasta el momento (Riojas et al., 2018). Proponen que todas las especies se incluyan bajo una misma especie llamada *M. tuberculosis* y, para conservar el nombre tradicional de cada especie, se nombre con la variante correspondiente. Por ejemplo, *M. bovis* se llamaría *M. tuberculosis* variedad *bovis*.

### 1.2.4. Complejo *Mycobacterium avium*

El complejo *M. avium* (MAC) es otro grupo de bacterias relacionadas genéticamente pertenecientes al género *Mycobacterium*. Se encuadra dentro del grupo de las micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento. También es relevante por producir infecciones en el hombre y los animales y porque la infección por MAC puede originar interferencia con las pruebas diagnósticas de la tuberculosis debido a la similitud antigénica existente entre especies del mismo género (Cooney, 1997). Este grupo incluye tres especies: *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. chimaera* (Runyon, 1967; Thorel et al., 1990;

Tortoli et al., 2004). Dentro de *M. avium* se estableció tres subespecies basadas en características fenotípicas y de ADN (Thorel et al., 1990):

- *M. avium* subespecie *avium* (causante de la tuberculosis aviar),
- *M. avium* subespecie *silvaticum* (causante de micobacteriosis en aves y rumiantes)
- *M. avium* subespecie *paratuberculosis* (agente causal de la paratuberculosis).

En un estudio posterior se definió una nueva subespecie, *M. avium* subespecie *hominisuis*, por aislarse con mayor frecuencia en humanos, cerdos y medioambiente y tener características fenotípicas y genéticas distintas a los aislados en aves (Mijs et al., 2002).

Entre los años 2004 y 2009 se han descrito nuevos miembros de este complejo como *M. arosiense* (Bang et al., 2008), *M. colombiense* (Murcia et al., 2006), *M. marseillense* (Ben Salah et al., 2009), *M. bouchedurhonense* (Ben Salah et al., 2009), *M. timonense* (Ben Salah et al., 2009) y *M. saskatchewanense* (Turenne et al., 2004). Además, se ha propuesto una nueva especie, *M. vulneris* (van Ingen et al., 2009).

### 1.3. Epidemiología

El MTBC incluye a todas las especies de micobacterias causantes de tuberculosis en mamíferos. Aunque existe cierta preferencia patógeno-hospedador, y cada especie se aísla con más frecuencia en una especie, la especificidad de hospedador es relativa y todos los miembros incluidos en el MTBC pueden ser potencialmente patógenos para otras especies.

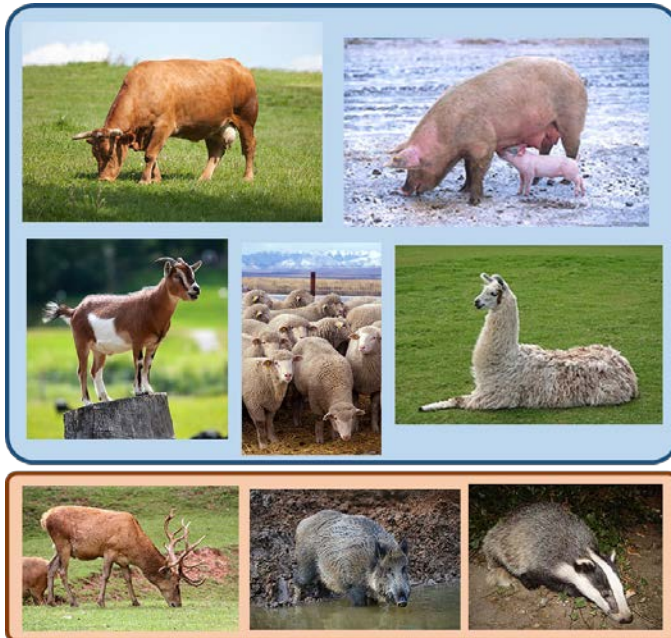
#### 1.3.1. Tuberculosis en animales

La tuberculosis en animales está causada por el MTBC, sobre todo por *M. bovis*. Este microorganismo tiene un amplio rango de hospedadores incluido el hombre (Morris et al., 1994; O'Reilly and Daborn, 1995). En el ganado bovino, la tuberculosis está sujeta a un programa de erradicación, pero no es un problema solo de los bóvidos; la infección se ha descrito en multitud de



## Introducción

especies de animales mamíferos tanto domésticas como salvajes (Pesciaroli et al., 2014). A pesar de aplicarse un programa de erradicación, la prevalencia de la tuberculosis en el ganado bovino en España permanece constante desde los últimos 10 años (MAPAMA, 2017). La falta de éxito en el programa de erradicación se debe a las particulares características epidemiológicas de la enfermedad, (Reviriego Gordejo and Vermeersch, 2006), incluido el papel de los animales domésticos y salvajes que actúan como reservorios. Estudios recientes atribuyen un papel importante a otras especies diferentes de los bovinos, como las cabras, ovejas y cerdos dentro de los animales domésticos y el ciervo, jabalí o tejones entre las especies silvestres (Bailey et al., 2013; Gortazar et al., 2017; Munoz-Mendoza et al., 2016; Murphy et al., 2010; Zanardi et al., 2013).



**Figura I1.** Principales especies domésticas y salvajes implicadas en el mantenimiento de la tuberculosis en Europa. *Fuente de las imágenes: Wikipedia.*

### Animales domésticos:

La tuberculosis en el ganado bovino es una de las enfermedades en animales más importantes en todo el mundo (Reviriego Gordejo and Vermeersch, 2006;

Schiller et al., 2011) y está incluida en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE). La tuberculosis bovina se considera de gran importancia socioeconómica y para la salud pública, con implicaciones para el comercio internacional de animales y productos de origen animal (OIE, 2009). Se estima que en el ganado bovino la tuberculosis causa aproximadamente una disminución en un 10-20% de la producción lechera y cárnica (Bennett and Cooke, 2006; Boland et al., 2010) y una disminución del 5% en la capacidad reproductiva de los rebaños.

La tuberculosis bovina es una zoonosis de distribución mundial, aunque presenta grandes variaciones en su prevalencia. Mientras que en los países desarrollados la enfermedad está erradicada o su prevalencia ha sido reducida drásticamente gracias a los programas de erradicación implementados, en la mayoría de los países en desarrollo sigue siendo una enfermedad endémica (Habarugira et al., 2014). En Canadá, Estados Unidos y Europa occidental, la infección se ha reducido en determinadas localizaciones a niveles inferiores al 0,1 % (Koller-Jones, 2010; Reviriego Gordejo and Vermeersch, 2006; Wobeser, 2009). En Centro América, con excepción de Nicaragua y el Caribe, el porcentaje de animales afectados es menor al 1% (Abalos and Retamal, 2004; de Kantor and Ritacco, 2006), mientras que Cuba está libre de la enfermedad (Abdalla, 1998). A nivel mundial las prevalencias más elevadas se encuentran en América del Sur (de Kantor and Ritacco, 2006), gran parte de África y ciertas partes de Asia (Cosivi et al., 1998).

A diferencia de cuanto ocurre con el ganado bovino, y a pesar de primeras indicaciones sobre la importancia potencial de las infecciones en caprino y porcino (Parra et al., 2005), el papel de otras especies ganaderas como reservorios de MTBC se ha asumido de forma bastante reciente: cerdos (Di Marco et al., 2012; Napp et al., 2013), cabras (Bezoz et al., 2012) y ovejas (Munoz-Mendoza et al., 2016). Por consiguiente, cabra, oveja y cerdo merecen consideración, al menos en situaciones concretas.

En el caso de la cabra, debido a que la tuberculosis caprina no está incluida en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la OIE

## Introducción

(OIE, 2018), no está sometida a campaña de erradicación específica, salvo en aquellos países con tuberculosis bovina, cuando la leche se destina para la producción de quesos en crudo y en rebaños donde conviven ganado bovino y caprino (EC Regulation 853/2004). Se ha demostrado que las cabras infectadas constituyen una importante fuente de infección para el ganado bovino (Napp et al., 2013; Zanardi et al., 2013) y contribuye a la aparición de brotes en éstos, lo que dificulta la erradicación de la tuberculosis (Humblet et al., 2009). En Castilla y León se determinó una elevada correlación entre el censo de cabras existente y el número de aislamientos de tuberculosis de origen caprino en el ganado bovino ya que las zonas donde pastan cabras y vacas permiten el contacto entre estas especies y, por lo tanto, la transmisión de las bacterias (Gumi et al., 2011; Kassa et al., 2012; Munoz Mendoza et al., 2012). Hasta hace muy poco, las ovejas no se consideraban reservorios de tuberculosis por lo que existen muy pocos estudios sobre el papel del ganado ovino en la epidemiología de la tuberculosis. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que las ovejas también se pueden infectar en pastos compartidos con vacas o cabras infectadas (Marianelli et al., 2010; Munoz Mendoza et al., 2012) o mediante el contacto con animales salvajes infectados (van der Burgt et al., 2013), y por consiguiente constituyen otro factor a tener en cuenta para la erradicación de la tuberculosis en el ganado bovino. En el caso del cerdo, *M. bovis* ha resurgido debido al sistema de cría de cerdos al aire libre, como se demostró en un estudio británico (Bailey et al., 2013). Además, estudios recientes han demostrado que los cerdos domésticos criados en territorios donde *M. bovis* es endémico en el ganado o en animales salvajes que se desplazan libremente pueden contribuir a la propagación de la enfermedad (Cardoso-Toset et al., 2015). En consecuencia, debido a lo anterior, la erradicación de la tuberculosis en el ganado no debe ignorar la tuberculosis en otras especies domésticas. Por lo tanto, el diagnóstico correcto de animales infectados en otras especies además del ganado se convierte en un objetivo clave en la erradicación de la tuberculosis.

Con respecto a camélidos del Nuevo mundo (SAC, *South American Camelids*, su censo está aumentando en Europa, no solo para la producción

de fibra sino también como animales de compañía (Barlow et al., 1999; D'Alterio et al., 2006). La introducción y el aumento del número de animales hacen a esta especie un nuevo hospedador para distintas bacterias y, en el caso de enfermedades zoonóticas, un riesgo para la salud pública. Entre estas enfermedades, las alpacas y las llamas son susceptibles de padecer tuberculosis, producida por bacterias del MTBC, sobretudo *M. bovis* y *M. microti* (Twomey et al., 2007; Zanolari et al., 2009). La falta de control de la enfermedad en estos animales puede suponer un problema para los programas de erradicación del ganado bovino y el diagnóstico es un punto clave.

También se ha descrito en otras especies domésticas como équidos (Keck et al., 2010), y roedores (Kipar et al., 2014), y en animales considerados como mascotas para el ser humano también se ha identificado esta enfermedad, como en cánidos (Ellis et al., 2006) y félidos (Cima, 2014), hámster (Glover, 1946) y hurón (Pollock, 2012).

### Animales salvajes

La tuberculosis también se ha descrito en animales salvajes que podrían considerarse fuente de infección para las especies de domésticas, y esporádicamente para el hombre (contacto ocupacional: veterinarios, personal de mataderos y cazadores). Las principales especies no domésticas en las que se ha descrito la enfermedad son el jabalí en España (Gortazar et al., 2011; Nugent et al., 2015), el ciervo de cola roja en España y de cola blanca en Michigan (Estados Unidos) (Gortazar et al., 2011; Kukielka et al., 2013), la zarigüeya en Nueva Zelanda (Palmer, 2013), el búfalo en Suráfrica (Michel, 2002) y el tejón en España, Irlanda y Reino Unido (Balseiro et al., 2013; Tomlinson et al., 2015).

El jabalí es un excelente indicador de la presencia de MTBC en su entorno, dado que es altamente susceptible a la infección (Nugent et al., 2015) y existen técnicas sencillas y accesibles para el diagnóstico de tuberculosis en esta especie (Santos et al., 2010). En España, el jabalí constituye además un importante reservorio de MTBC. Esto queda

## Introducción

demostrado de forma muy especial en granjas y cercones donde el jabalí mantiene altas prevalencias en ausencia de contacto con otros hospedadores (Naranjo et al., 2008). La infección puede tener lugar a edades muy tempranas, durante el primer verano de vida (Che' Amat et al., 2015), y tiende a producir lesiones generalizadas con afección del pulmón en la mitad de los individuos infectados, principalmente a partir del primer año de vida (Vicente et al., 2013). Un tercio de los jabalíes infectados presenta cantidades importantes de ADN (concentraciones  $>103$  ucf por g o ml), pudiendo ser considerados “superexcretadores” (Barasona et al., 2016). Estos “superexcretadores” con TB generalizada son probablemente los principales diseminadores de MTBC en espacios naturales y explotaciones ganaderas vecinas.

En España existen más de 80 granjas de ciervo registradas en Registro de Explotaciones Ganaderas (REGA). La tuberculosis es uno de los principales problemas de la producción de ciervos y gamos de granja (Boadella et al., 2012). El hecho de que MTBC se mantenga en condiciones de granja, es decir en ausencia de contacto con otros hospedadores relevantes, pone de manifiesto que estos cérvidos, al igual que el jabalí, pueden constituir verdaderos reservorios. En condiciones naturales, sin embargo, es difícil encontrar situaciones en las que sólo haya ciervos, sin presencia significativa de jabalíes o tejones. En la Península Ibérica la detección de ciervos y gamos infectados es frecuente, particularmente en el cuadrante suroeste (Vicente et al., 2006), y su participación en el conjunto del reservorio silvestre está confirmada en esta región (Santos et al., 2015).

En Gran Bretaña e Irlanda, el tejón es el principal reservorio silvestre de MTBC. Además, la infección se ha diagnosticado en tejones en varios otros países europeos, principalmente en Francia. En España el papel del tejón en el mantenimiento de MTBC está todavía por confirmar, aunque es probable su implicación al menos local (Balseiro et al., 2011).

### 1.3.2. Tuberculosis en humano de origen animal

A pesar de que el MTBC engloba multitud de especies potencialmente patógenas para el hombre, el principal agente etiológico de la tuberculosis en el ser humano es *M. tuberculosis*. Se estima que *M. tuberculosis* es responsable del 99% (OMS, 2018) de todos los casos de tuberculosis en humanos y que aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada, causando dos millones de muertes anuales [datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 2018].

Los casos de tuberculosis zoonótica se informan comúnmente como una proporción del número total de casos de tuberculosis humana. Sin embargo, estas proporciones generalmente no se basan en datos representativos a nivel nacional. En cambio, a menudo se derivan de estudios que involucran solo grupos específicos y seleccionados de pacientes, como los que se presentan en hospitales de referencia terciarios. Además, el riesgo de enfermedad aumenta en áreas donde la tuberculosis bovina es endémica y donde las personas viven en condiciones que favorecen el contacto directo con animales infectados (es decir, agricultores, veterinarios y mataderos) o productos animales (leche no pasteurizada y productos animales no tratados). Además, las áreas donde la tuberculosis bovina es endémica a veces se superponen con áreas donde la prevalencia del VIH es alta (es decir, en algunos países africanos). En consecuencia, no es sorprendente que las proporciones informadas de casos de tuberculosis humana causadas por *M. bovis* sean muy variables.

### 1.3.3. Situación de la tuberculosis en Europa

La tuberculosis debido a *M. bovis* y *M. caprae* en humanos en la Unión Europea es una enfermedad muy rara debido a décadas de control y la eliminación de la bacteria tanto en el ganado como en la leche gracias a la pasteurización rutinaria de la misma. Los casos de *M. bovis* en humanos representan una pequeña proporción (>0,3%) de todos los casos confirmados

## Introducción

de tuberculosis reportados en 2016 en la Unión Europea (ECDC Surveillance Atlas of Infectious Diseases).

Los datos de seguimiento de 2016 sobre la tuberculosis bovina en el ganado de la UE demuestran que la situación actual en Europa sobre la infección, detección y control de la tuberculosis bovina es heterogénea según lo documentado por la EFSA (EFSA, 2017). La prevalencia varía desde la ausencia de animales infectados en la mayoría de las regiones oficialmente libre de tuberculosis (OTF) hasta una prevalencia regional en países no-OTF del 15,1% en Andalucía (España) o del 18,4% dentro del Reino Unido en Gales e Inglaterra. En las regiones OTF de 21 estados miembros durante 2016, se detectaron 147 rebaños de ganado infectados, resultando en una prevalencia de rebaños infectados con tuberculosis bovina del 0,012%, lo que significa que la infección de rebaños en estas regiones OTF es un evento ocasional. Los 147 rebaños infectados con tuberculosis bovina fueron notificados por 8 países; en siete (Bélgica, Francia, Alemania, Hungría, Italia, Polonia y el Reino Unido) se aisló *M. bovis*, mientras que Austria notificó rebaños infectados con *M. caprae*.



**Figura 12.** Situación de la tuberculosis bovina en Europa en el año 2016. Fuente, EFSA 2016

En las regiones no-OTF de los 10 Estados miembros no-OTF, la prevalencia general de rebaños bovinos positivos a la tuberculosis bovina aumentó del 1,1% en 2010 al 1,6% en 2016. Este ligero aumento podría explicarse por la declaración gradual de algunos estados y/o regiones no-OTF como OTF, lo que hace que el número de rebaños de ganado en zonas no libres disminuya de 2010 a 2016. Los 10 países no libres, excepto Chipre, informaron haber detectado tuberculosis bovina. A nivel de país, Reino Unido registró una prevalencia de 16,7% a nivel de rebaño en Gales e Inglaterra, que oscilaron en los años anteriores entre 13,1% y 20,3%, y del 9,7% en Irlanda del Norte, lo que supuso un ligero aumento. Grecia, Irlanda y España informaron una prevalencia del 3,8%, 2,9% y 3,6% respectivamente, lo que indica que se mantiene estable en Irlanda mientras que en Grecia y España supone un incremento con respecto a años anteriores. La prevalencia en Italia y Portugal fue muy baja (> 0,1-1%) y muy baja en Croacia, Bulgaria y Rumania (<0,1%).

En 2016, *M. bovis* solo se aisló en el ganado bovino sino también en una amplia gama de especies animales, tanto domésticas como silvestres (cabras, ovejas, cerdos, búfalos de agua, ciervos, jabalíes, corzos y tejones), lo que refleja el amplio rango de hospedadores de este agente causante de la tuberculosis en el ganado. *M. caprae*, también conocido como causante de tuberculosis bovina, se notificó en bovinos, cabras, ovejas, jabalíes y ciervos salvajes en algunos países.

### 1.3.4. Situación de la tuberculosis en España

Actualmente, según los datos del Ministerio Agricultura y pesca, alimentación y medio ambiente, la prevalencia de tuberculosis bovina en España para el año 2016 fue del 2,87% a nivel de rebaño y del 0,51% a nivel de animal (MAPAMA, 2017).

La tendencia que ha manifestado la prevalencia a nivel de rebaño ha sido decreciente hasta el año 2013, tras el cual este indicador ha sufrido un repunte, sobre todo en 2015 y 2016, dejándolo a niveles del año 2001. La



## Introducción

evolución de la enfermedad en las distintas Comunidades Autónomas se refleja en la siguiente tabla:

**Tabla I2.** Prevalencia de la tuberculosis bovina a nivel de rebaño en España durante el año 2016. Fuente: MAPAMA, 2017.

CCAA	PREVALENCIA DE REBAÑO														
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
ANDALUCÍA	9,65	8,47	6,73	5,32	5,76	4,15	5,80	8,94	8,54	6,16	5,69	5,94	11,51	17,24	17,10
ARAGON	3,14	2,75	2,03	1,56	1,96	3,65	0,75	0,70	1,22	1,62	1,38	0,71	0,58	0,81	0,73
ASTURIAS	0,32	0,22	0,24	0,18	0,17	0,24	0,22	0,21	0,18	0,14	0,19	0,20	0,21	0,28	0,17
BALEARES	0,92	1,02	0,65	0,65	0,22	0,21	0,00	0,00	0,17	0,00	0,40	0,60	0,41	0,60	0,00
CANARIAS	0,34	1,05	2,40	1,00	0,36	0,37	0,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CANTABRIA	1,00	1,34	1,41	1,16	1,05	2,25	1,57	0,91	0,79	0,74	0,89	0,88	0,70	1,38	0,83
CASTILLA LA MANCHA	7,69	3,36	7,19	7,02	7,71	9,51	11,62	10,27	7,11	5,35	3,54	3,33	7,21	7,63	7,84
CASTILLA Y LEON	5,10	5,66	3,78	3,37	5,11	4,16	3,71	2,75	2,62	2,57	2,66	2,88	2,22	1,93	1,87
CATALUÑA	1,93	1,74	1,78	1,70	1,65	1,08	0,85	0,83	0,59	0,81	0,25	0,04	0,16	0,32	0,30
EXTREMADURA	7,45	5,95	5,57	4,05	4,84	3,74	3,37	3,78	3,04	3,11	3,29	4,53	4,62	12,23	12,96
GALICIA	0,52	0,43	0,46	0,31	0,20	0,19	0,11	0,22	0,28	0,19	0,21	0,12	0,11	0,08	0,05
LA RIOJA	2,05	2,70	2,76	1,31	0,72	0,70	1,45	0,75	1,14	0,38	0,36	0,37	0,72	2,81	3,86
MADRID	3,69	3,92	1,99	2,58	2,59	3,41	5,72	5,54	5,45	7,22	6,13	4,51	3,55	3,86	3,04
MURCIA	5,79	1,48	7,59	4,46	4,96	8,05	3,29	3,51	1,59	0,33	1,40	1,84	0,94	1,66	2,90
NAVARRA	0,52	0,82	0,36	0,38	0,27	0,33	0,40	0,30	0,67	0,65	0,30	0,66	0,67	0,50	0,64
PAIS VASCO	0,06	0,17	0,22	0,64	0,19	0,14	0,20	0,57	0,37	0,33	0,25	0,17	0,25	0,16	0,17
VALENCIA	12,47	5,56	2,63	2,16	1,61	1,14	1,41	1,38	3,84	1,94	1,55	2,88	3,06	2,73	1,99
TOTAL	2,24	2,14	1,80	1,52	1,76	1,63	1,59	1,65	1,51	1,33	1,31	1,39	1,72	2,81	2,87

La aplicación del Programa Nacional ha supuesto en 2015 y 2016 un marcado retroceso en la evolución de la lucha frente a la enfermedad aunque todo parece indicar que se debe a incremento de la sensibilidad diagnóstica que está haciendo aflorar la infección residual, principal factor de riesgo en España (elevado número de pruebas de gamma-interferón realizadas en rebaños infectados, la realización de los cursos y pruebas de validación para los veterinarios de campo en 2012-2015 y el aumento de los controles oficiales sobre estos veterinarios).

### 1.4. Respuesta inmune frente a la tuberculosis

La respuesta inmune inducida tras la infección por *M. tuberculosis* ha sido ampliamente estudiada en humanos (Achkar et al., 2015; Jasenosky et al., 2015; Lin and Flynn, 2015). Sin embargo, se dispone de muy poca información respecto al papel que tienen el resto de miembros del MTBC en la respuesta inmune, a pesar de que la gran similitud genética observada entre los miembros del MTBC parece sugerir que la respuesta inmune inducida tras la

infección podría ser similar independientemente de la especie bacteriana implicada (Waters et al., 2011b).

La transmisión de bacterias del MTBC entre animales se produce principalmente por la vía respiratoria a través de la inhalación de aerosoles que contienen las bacterias cuando los animales están en estrecho contacto. A pesar de que esta vía de transmisión se ha considerado históricamente como la vía de infección predominante, la vía oral de infección debido a la ingestión de micobacterias del medio ambiente juega un papel fundamental en la transmisión y mantenimiento de la enfermedad.

Las fuentes de *M. bovis* para animales incluyen alimento o agua contaminada con orina, heces o exudados de un animal infectado (Thoen, 2008). Además, la vía indirecta en zonas compartidas parece ser importante para la transmisión entre especies (interfaz doméstico-salvaje, (Palmer et al., 2004) El uso común de fuentes naturales de agua por parte de animales domésticos y animales salvajes también podría transmitir la enfermedad ya que *M. bovis* puede sobrevivir durante algún tiempo en el medio ambiente (Kukielka et al., 2013; Santos et al., 2015). Esta observación es clave para comprender la transmisión indirecta y el mantenimiento de la infección en entornos complejos, que involucran hospedadores de múltiples especies.

En áreas mediterráneas con una alta prevalencia de tuberculosis, es común detectar el ADN de MTBC en muestras de lodo y agua (Barasona et al., 2017; Santos et al., 2015), donde el contacto directo entre especies es raro (Kukielka et al., 2013). Por lo tanto, la transmisión entre especies de MTBC depende principalmente de contactos indirectos. Especialmente en los entornos mediterráneos, existe un alto riesgo de estos contactos en los pozos de agua y otros puntos de agua durante la estación seca (Barasona et al., 2014).

El resultado de la infección depende del poder protector del sistema inmunitario del hospedador y la patogenicidad de la bacteria. En el ser humano, la mayoría de los individuos son capaces de controlarla y contenerla en el interior de un granuloma, un agregado de células inmunitarias que envuelve a la micobacteria, pero no es capaz de eliminarla. Debido a esto,

## Introducción

la infección pasar a ser latente y el individuo está en riesgo de reactivar la enfermedad en el futuro en caso de inmunocompromiso.

La combinación de la respuesta inmune innata y adaptativa (principalmente mediada por Th1) culmina con el desarrollo de los granulomas (Davis and Ramakrishnan, 2009). La infiltración de células en los pulmones durante la respuesta inicial se convierte en un granuloma primario con macrófagos localizados en el centro. Esto conlleva la formación de un granuloma sólido y bien organizado cuando se desarrolla la respuesta adaptativa y se inicia la infiltración de linfocitos T específicos y otras células como CD8+, NKs y  $\gamma\delta$ . Los macrófagos del centro suelen estar infectados, presentan un fenotipo activado o están diferenciados en células epitelioides. Algunos pueden combinarse para formar células gigantes multinucleadas (Domingo et al., 2014).

El centro del granuloma puede presentar necrosis caseosa y tener una apariencia de queso. Si la infección continúa, el centro puede licuarse produciendo un ambiente en el que las bacterias pueden crecer extracelularmente. La cavitación puede ocurrir si el contenido licuefactado es liberado en el árbol bronquial, donde puede ser expelido y contribuye a la transmisión a otros animales. Más comúnmente, los granulomas sufren fibrosis o calcificación, conteniéndose la infección y convirtiéndose en latente (Domingo et al., 2014).

### 1.4.1. Respuesta inmune innata

Las principales características de la respuesta inmune innata incluyen el reconocimiento de diversas estructuras moleculares ampliamente distribuidas entre patógenos por receptores como los TLR (Toll Like Receptors). El reconocimiento de *M. tuberculosis* durante la respuesta inmune innata lleva a la activación celular y a la producción de quemoquinas y citoquinas proinflamatorias. Estos mediadores reclutan células inflamatorias (células T, NK y neutrófilos) al área de infección y coordinan la respuesta inmune adaptativa.

En el espacio alveolar los mecanismos innatos de defensa involucran a diferentes tipos celulares como macrófagos alveolares, células dendríticas, neutrófilos, linfocitos B, células epiteliales, células alveolares tipo I y tipo II y factores solubles como mucina, lisosima, lactoferrina, surfactantes, defensinas, catelicidinas, fosfolipasa A2, inmunoglobulinas y proteínas del complemento, cuya función es mantener la homeostasis pulmonar y eliminar partículas o bacterias que entren por el tracto respiratorio.

Por tanto, en la respuesta inmune innata desarrollada ante la infección por las micobacterias juegan un papel importante una serie de células del sistema inmunológico y citoquinas producidas por las mismas. Las células que juegan un papel fundamental en la respuesta inmunitaria innata frente a la micobacteria son las siguientes:

- **Macrófagos alveolares:**

Unas de las primeras células que se encuentran con la microbacteria en los pulmones son los macrófagos alveolares. Se trata de fagocitos que responden ante patógenos invasores en una manera no específica, y proveen una primera línea de defensa. Los macrófagos y otras células presentadoras de antígeno (APCs) reconocen y fagocitan a la microbacteria, englobándolas en fagosomas.

Después de la fagocitosis, los fagosomas maduran y se fusionan con endosomas y lisosomas. El ambiente pasa a ser ácido y pobre en nutrientes, y la bacteria se expone a péptidos antimicrobianos y enzimas de degradación del lisosoma, como la lisozima (Flynn and Chan, 2001). Sin embargo, las micobacterias patógenas han desarrollado mecanismos para evitar las defensas del hospedador, entre ellos el bloqueo de la maduración del fagosoma permitiendo que la infección progrese en el hospedador (Pieters and Gatfield, 2002; Ulrichs and Kaufmann, 2003). Pese a ello, la activación de los macrófagos por el IFN- $\gamma$  promueve la destrucción bacteriana a través de la formación de intermediarios reactivos de oxígeno (IRO) e intermediarios reactivos de nitrógeno (IRN). Los macrófagos activados también liberan un conjunto de citoquinas y quimioquinas, incluyendo el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que inducen una respuesta proinflamatoria y dirige a otras

## Introducción

células inmunitarias al sitio de infección donde se está replicando la micobacteria e intentar destruir la bacteria y controlar la infección (McNair et al., 2007; Pollock et al., 2005).

- **Células dendríticas:**

Las células dendríticas son células características del sistema inmune de los mamíferos (Mayer, 2006). Su función principal, junto con los macrófagos activados, es la de procesar el antígeno y presentar componentes en su superficie junto a las moléculas del MHC de clase II. Las células dendríticas migran a los nódulos linfáticos donde se encuentran a un gran número de células T naïve. Las células T CD4+ naïve rastrean los complejos antígeno/MHC en la superficie de estas células. Después del reconocimiento del complejo específico para su receptor de célula T (TCR), la célula CD4+ se activa, prolifera y, en presencia de citocinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$  e IL-12, se diferencia en célula T helper 1 (Th1) (Baldwin & Telfer, 2015).

- **Neutrófilos:**

Los neutrófilos son las primeras células en acudir al foco de infección (Mayer, 2006). Al encontrarse en el torrente sanguíneo, tras el proceso inflamatorio originado por la micobacteria atraviesan las paredes de los vasos sanguíneos, lo que le permite llegar rápidamente al foco de infección (Flynn and Chan, 2001). Los neutrófilos también poseen capacidad fagocítica, pero contienen las enzimas líticas en gránulos en lugar de lisosomas que son los que posteriormente se unen a los fagosomas (Korbel et al., 2008).

- **Células asesinas naturales (*Natural killer cells*):**

Las células asesinas naturales (NK) son capaces de lisis directamente la micobacteria o los monocitos/macrófagos que la contienen y evitar así que la enfermedad progrese. La función de las células NK es primordial durante las fases tempranas de la infección ya que activan a las células fagocíticas. De hecho, la disminución de la actividad de las células NK se ha asociado con tuberculosis multirresistente en el ser humano (Ratcliffe et al., 1994).

### 1.4.2. Respuesta inmune adaptativa

La respuesta inmune adaptativa requiere de un primer contacto con el antígeno para que se desarrolle la memoria inmunológica (Kindt, 2007), de esta manera en caso de reinfección, la respuesta inmune se desencadena en el hospedador de una forma más rápida.

Tras la infección, se diferencian dos tipos de respuesta inmunológicas implicadas para contener el avance del patógeno: respuesta inmunológica de base celular (mediada principalmente por linfocitos T), y de base humoral (mediada por anticuerpos). Hasta la fecha, no ha sido posible definir con exactitud el inicio y el fin de ambas respuestas, ya que este parámetro depende de multitud de factores ajenos al sistema inmune del hospedador (Palmer, 2007; Pollock et al., 2005).

#### **Respuesta inmune celular:**

En la tuberculosis, la respuesta inmune con mayor relevancia es la respuesta inmune celular. Este tipo de respuesta, en una infección por micobacterias involucra una crítica interrelación entre linfocitos T, células presentadoras de antígenos y mediadores solubles (citoquinas y quemoquinas) (Baldwin and Telfer, 2015). La respuesta inmune celular es de mayor intensidad en las primeras fases tras la infección, y su eficacia se correlaciona directamente con la capacidad protectora frente a la tuberculosis (Flynn and Chan, 2001; Pollock and Neill, 2002). Se ha observado que la deficiencia de una respuesta T en humanos, ya sea por inmunodeficiencias o por tratamientos supresores de células T, está relacionada con un mayor riesgo de padecer tuberculosis (Havir and Barnes, 1999), y no ocurre lo mismo en caso de deficiencia de células B.

Los linfocitos T se diferencian en dos poblaciones: Th (CD4+) y Tc (CD8+) que participan activamente en la respuesta inmune (Jasenosky et al., 2015; Lin and Flynn, 2015). En animales infectados de manera experimental con *M. bovis* se ha observado que los linfocitos T CD4+ son la principal población celular productora de IFN- $\gamma$  (responsable de la activación de los macrófagos), mientras que los linfocitos T CD8+ son los responsables de lisar

## Introducción

las células infectadas (Liebana et al., 1999), para evitar el avance de la infección.

A su vez, los linfocitos Th se diferencian en dos poblaciones: Th1 y Th2. La respuesta inmune protectora en tuberculosis es una respuesta Th1 ya que la inmunidad celular y la producción de citoquinas proinflamatorias (fundamentalmente IFN- $\gamma$ ) es crítica para el control de la enfermedad (Robinson et al., 2015), al incrementar la actividad de los macrófagos y controlar así la progresión de las micobacterias. En caso de predominar los linfocitos Th2, la producción de citoquinas antiinflamatorias está favorecida lo que conlleva al desarrollo de una respuesta de tipo humoral permitiendo, por tanto, la progresión de la enfermedad (McNair et al., 2007). El balance entre las dos poblaciones de linfocitos Th (Th1/Th2) será, por tanto, el que determine la evolución de la infección (Pollock et al., 2005).

Las células T CD8 han sido consideradas de menor relevancia que las CD4+ en el control de la infección por micobacterias. Sin embargo, se ha sugerido que las células T CD8+ podrían contribuir a la respuesta inmune frente al bacilo tuberculoso, al menos por tres mecanismos: secreción de IFN- $\gamma$ , lisis de células infectadas por la interacción Fas/Fas-ligando o mediado por la acción de perforinas y granzimas, y actividad micobactericida directa (Ferraz et al., 2006).

Aunque no se ha definido con exactitud la duración de la respuesta inmune celular, se estima que se mantiene aproximadamente entre 6 y 8 meses tras la infección (Pollock et al., 2005). En un estudio realizado en ganado bovino infectado de manera experimental se ha descrito que la respuesta de base celular se manifiesta entre 15 y 29 días tras la infección (Waters et al., 2012), lo que permite detectar animales infectados mediante la IDTB aproximadamente cuatro semanas tras la infección (Bezoz et al., 2014a) y por el test de detección de IFN- $\gamma$  desde la segunda semana tras la infección, en ganado bovino (Buddle et al., 2010) y caprino (Bezoz et al., 2011).

### Respuesta inmune humoral:

El papel de la respuesta inmune humoral en la tuberculosis sigue siendo muy controvertido (Achkar et al., 2015). Se sabe desde hace mucho tiempo que las células T juegan un papel importante en la inmunidad de la TB y son el objetivo de las estrategias de vacunación actuales (Andersen and Kaufmann, 2014). La respuesta inmune de base humoral no se ha considerado relevante en las primeras fases tras la infección desde el punto de vista de la protección ya que, como patógeno intracelular, se ha supuesto que *M. tuberculosis* sería inaccesible a los anticuerpos circulantes; sin embargo, las células infectadas con *M. tuberculosis* serían susceptibles a ser destruidas por las células efectoras de la respuesta inmune mediada por células (Flynn and Chan, 2001). Sin embargo, la evidencia más reciente apunta hacia un papel de las células B en la modulación de las respuestas inmunes a la infección por MTBC, por ejemplo, como células presentadoras de antígenos o mediante la producción de citocinas y anticuerpos (Achkar et al., 2015).

Aunque anteriormente se creía que los anticuerpos tenían poca influencia en la defensa frente a patógenos intracelulares, este concepto ha cambiado en las últimas décadas (Casadevall and Pirofski, 2006). Los anticuerpos frente a patógenos intracelulares pueden mediar la protección a través de diversos mecanismos. Los anticuerpos pueden ejercer sus funciones de dos maneras: mediante el bloqueo directo de la entrada de la bacteria a la célula y la neutralización de productos bacterianos, o indirectamente a través del sistema del complemento y mecanismos de activación celular, ambos mediados por los receptores Fc (Ravetch and Clynes, 1998).

En los últimos dos años, varias publicaciones han promovido una reevaluación de la contribución de inmunidad mediada por anticuerpos frente a *M. tuberculosis* (Chen et al., 2016; Li et al., 2017; Lu et al., 2016; Zimmermann et al., 2016).

Chen et al (2016) obtuvieron suero de 30 voluntarios sanos inmunizados con BCG, que estimula tanto la inmunidad celular como la humoral. Demostraron que la BCG provocó respuestas de anticuerpos contra



## Introducción

arabinomanano y LAM y que el suero postvacunal pudo opsonizar *M. tuberculosis*, lo cual condujo a la fagocitosis mediada por macrófagos, mejoró la fusión de los fagolisosomas e inhibió el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*. Es importante destacar que en este estudio concluyeron el título de anticuerpos específicos de arabinomanano en los individuos podría contribuir a la defensa contra la infección micobacteriana en humanos.

Lu et al (2016) examinaron el suero policlonal de 20 pacientes con tuberculosis activa y 22 individuos con infección latente de tuberculosis, pero sin síntomas o signos de infección activa. Usando un perfil de anticuerpos, mostraron que las personas con infección latente de tuberculosis y tuberculosis activa tienen distintas respuestas humorales específicas frente a *M. tuberculosis*: la infección latente de tuberculosis se asocia con perfiles funcionales de anticuerpos únicos, unión selectiva a FcγRIII y distintos patrones de glicosilación de los anticuerpos. Por otra parte, en experimentos en los que macrófagos humanos se infectaron con *M. tuberculosis*, los anticuerpos de los individuos con infección latente fueron mejores en la restricción del crecimiento intracelular del patógeno que los anticuerpos de pacientes con tuberculosis activa, produciendo una mejor maduración de los fagolisosomas, la activación de inflammasomas y, lo que es más importante, la destrucción de macrófagos infectados con *M. tuberculosis*. Todos estos datos combinados apuntan a un papel potencial para las funciones efectoras de los anticuerpos mediadas por Fc, modulada mediante glicosilación diferencial, en el control de *M. tuberculosis*.

Zimmermann et al. (2016) detectaron anticuerpos específicos frente a *M. tuberculosis* en pacientes con tuberculosis activa y trabajadores sanitarios. Aproximadamente el 40% de los anticuerpos monoclonales aislados de los plasmoblastos de estos individuos reconocieron antígenos micobacterianos, y la mayoría de estos anticuerpos específicos de *M. tuberculosis* se dirigen a los antígenos expuestos en la superficie. En este estudio también determinaron que la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* dependía del isotipo ya que observaron que los anticuerpos IgA inhibían la infección de las células epiteliales mientras que los anticuerpos IgG promueven la invasión de micobacterias, lo que sugiere que más que el

antígeno o el epítipo es el isotipo el que condiciona la inhibición del crecimiento bacteriano.

En conjunto, estos estudios revivieron el interés en la inmunidad humoral a la tuberculosis y sugirieron que los sujetos con una alta exposición a *M. tuberculosis*, pero sin tuberculosis activa representan la población ideal para estudiar y aislar anticuerpos protectores. A pesar de todo esto, todavía no se conoce cómo los anticuerpos protegen frente a la tuberculosis. Lo que está claro es que la protección parece ser más compleja que la simple neutralización de bacterias y requiere funciones inmunes mediadas por células, como por ejemplo a través de los macrófagos, la formación del complejo inmune o las respuestas de las células T, aunque la evidencia de muchos de estos mecanismos todavía es muy preliminar (Li and Javid, 2018).

### 1.4.3. Citoquinas implicadas

Las citoquinas son proteínas que regulan la función de las células que las producen sobre otros tipos celulares. Son los agentes responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas. Las citoquinas son fundamentales en la infección producida por las micobacterias, ya que la producción de un tipo u otro puede ser determinante en la evolución de la enfermedad. Hay citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias.

#### **Citoquinas pro-inflamatorias:**

La interacción entre la micobacteria y la célula fagocítica conlleva la producción de diversas citoquinas. Esta producción de citoquinas juega un papel muy importante en la respuesta inflamatoria y en el desarrollo de la infección. Las citoquinas más importantes son las siguientes:

- **Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ):** es una citoquina fundamental en la infección por bacterias del MTBC por los linfocitos T. Su función

principal es la activación de macrófagos y niveles elevados de esta citoquina se ha relacionado con una mayor protección frente a tuberculosis (Bhatt et al., 2015). Su detección se utiliza en el diagnóstico de animales infectados por *M. bovis* en una prueba llamada test de detección del IFN- $\gamma$ , tras la estimulación de sangre procedente de animales infectados con antígenos específicos de micobacterias, usualmente el derivado proteico purificado de *M. bovis* (PPDb o PPD bovina). Las células NK también son productoras, aunque en menor medida, de IFN- $\gamma$  de forma inespecífica. Otras células que se están estudiando como posibles productoras de IFN- $\gamma$  en estas primeras fases son los macrófagos alveolares y las células T gamma-delta (T $\gamma\delta$ ). Las células T $\gamma\delta$  constituyen en los bovinos (y en otros rumiantes) una gran proporción del total de las células mononucleares de sangre periférica.

- **Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ):** esta citoquina juega un papel clave en el control inicial y a largo plazo de la tuberculosis, aunque el mecanismo mediante el que lleva a cabo este control no está claro (Lin et al., 2007). Su función es la activación de los macrófagos y el reclutamiento celular a sitio de infección. Tiene un papel fundamental en la formación de los granulomas.
- **Interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ):** es una citoquina producida por monocitos, macrófagos y células dendríticas. Se expresa en exceso en el lugar de infección y su carencia origina multiplicación bacteriana y alteraciones en la formación de los granulomas (Coad et al., 2010; Jones et al., 2010).
- **IL-6:** citoquina producida por los linfocitos Th2, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos que posee propiedades proinflamatorias y antiinflamatorias. Se ha observado que puede inhibir la producción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y, además, su deficiencia aumenta la susceptibilidad a la infección debido a una deficiente producción de IFN- $\gamma$  por parte del animal (Xu et al., 2007; Zeng et al., 2015)
- **IL-12:** es una citocina proinflamatoria producida en los macrófagos, monocitos y otras células presentadoras de antígenos. Es una citoquina clave para el control de la enfermedad ya que induce la

proliferación de células T y su diferenciación hacia linfocitos Th1 que a su vez produce interferón gamma (INF- $\gamma$ ) (Chen et al., 2012).

- **IL-18 e IL-15:** junto con IL-12 contribuyen a la producción de INF- $\gamma$  (Perera et al., 2012). IL-18 actúa en sinergia con IL-12 y la IL-15 lo hace con otras citoquinas como IL-2, estimulando la activación y proliferación de células T y NK (Jacobs, 1957).

### Citoquinas anti-inflamatorias:

Estas citoquinas se encargan de inhibir la producción o los efectos de las citoquinas pro-inflamatorias. Las más importantes son:

- **IL-10:** producida principalmente por linfocitos Th2, macrófagos, linfocitos B y queratinocitos. IL-10 antagoniza la respuesta pro-inflamatoria mediante la disminución de la producción de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12, favoreciendo la progresión de la infección (Waters et al., 2003).
- **Factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ):** esta citoquina, al igual que IL-10, es producida en exceso durante la tuberculosis por parte de monocitos y células dendríticas. Se la relaciona con el daño tisular y la fibrosis originada en la tuberculosis, aunque sus actividades más destacables se engloban dentro de la respuesta inmune adquirida, ya que altera la presentación de antígeno y disminuye la producción de INF- $\gamma$  por parte de los linfocitos T (Hirsch et al., 1997).
- **IL-4:** producida por los linfocitos Th2, basófilos, mastocitos y eosinófilos activados. IL-4 participa en la regulación del sistema inmunitario en múltiples niveles. Entre otras funciones, promueve la diferenciación de linfocitos Th2, la proliferación y diferenciación de linfocitos B y es un potente inhibidor de la apoptosis. También suprime la producción de INF- $\gamma$  y por tanto evita la activación de los macrófagos. En infecciones experimentales se la ha relacionado con progresión de la enfermedad, reactivación de infecciones latentes e intensificación del daño tisular (Flynn and Chan, 2001).

### 1.5. Diagnóstico

Teniendo en cuenta los largos periodos de incubación y la necesidad de un diagnóstico precoz antes de los signos clínicos, el diagnóstico actual de la tuberculosis se basa fundamentalmente en la detección indirecta, mediante el empleo de pruebas que determinan la respuesta inmune desencadenada tras la infección y la detección directa del agente etiológico.

#### 1.5.1. Pruebas diagnósticas basadas en la respuesta inmune de base celular

Las pruebas incluidas en este grupo son aquellas que detectan la inmunidad mediada por células, que es la principal respuesta inmune implicada tras la infección para contener al patógeno (Flynn and Chan, 2001; Pollock and Neill, 2002). A nivel europeo, las pruebas incluidas en los programas de erradicación de la tuberculosis bovina (Directiva Europea 64/432/CEE) detectan esta respuesta inmune, ya que garantizan la mayor sensibilidad a la hora de detectar animales infectados para poder eliminarlos de la explotación antes de que la inmunidad mediada por células disminuya y se desarrolle la respuesta de base humoral (de la Rua-Domenech, 2006).

Las dos pruebas diagnósticas contempladas para la erradicación de la tuberculosis bovina (tal y como está detallado en el Programa Nacional) se basan en la detección de la respuesta inmune de base celular. Una vez que un animal es positivo a cualquiera de las dos pruebas diagnósticas se sacrifica en un plazo máximo de 15 días. Hasta la fecha el cultivo microbiológico es la técnica diagnóstica de elección (gold standard o prueba de referencia) para confirmar la infección en el rebaño.

##### 1. Intradermotuberculinización (IDTB):

La prueba oficial para la detección de la infección ante mortem es la prueba intradérmica (IDTB) simple que utiliza PPD<sub>b</sub> como sustancia antigénica, según lo establecido en el R.D. 2611/1996 de 20 de diciembre, y su modificación posterior, el R.D. 1047/2003 de 1 de agosto. En determinadas circunstancias y con el fin de aumentar la especificidad de la técnica se emplea la PPD aviar, realizándose la prueba intradérmica comparada (IDTBC). En la prueba

comparada se evalúa en el mismo individuo la respuesta frente al MBTC, en el que se incluyen las micobacterias causantes de tuberculosis, y al MAC, micobacterias que pueden producir interferencia diagnóstica al poseer ciertos antígenos comunes con el complejo MTBC. La prueba intradérmica debe realizarse en animales mayores a seis semanas de vida para evitar la aparición de reacciones inespecíficas (Gormley et al., 2013). Además, las PPDs empleadas deben estar contrastadas por el Laboratorio Nacional de Referencia y cumplir las especificaciones que figuran en la normativa comunitaria (Farmacopea Europea). Esta prueba puede realizarse en animales en los que no se haya aplicado anteriormente la IDTB en un periodo mínimo de 42 días.

El fundamento de la prueba intradérmica es reproducir de manera local una reacción de hipersensibilidad retardada o reacción de hipersensibilidad de tipo IV en los animales infectados. Una vez inoculada, la PPD origina una reacción inflamatoria mediada por células (principalmente linfocitos Th1 sensibilizados por un contacto previo) que tarda 2 ó 3 días en alcanzar su máximo desarrollo. Las citoquinas secretadas por ciertas subpoblaciones de linfocitos Th1 reclutan y activan monocitos y otras células inflamatorias hacia el punto de inoculación de la PPD produciendo una reacción inflamatoria compuesta por varios tipos celulares (predominan los macrófagos, pero también se han descrito células de Langerhans, linfocitos T y basófilos)(Palmer, 2007).

Es esencial que la inoculación intradérmica se realice siguiendo estrictamente el protocolo ya que cualquier modificación en el mismo puede alterar el resultado de la prueba. El procedimiento es el siguiente:

1. Rasurar el pelo del animal en la zona de inoculación (parte anterior de las tablas del cuello).
2. Medir el grosor del pliegue de la piel (parte anterior de las tablas del cuello) empleando un cutímetro.
3. Inocular intradérmicamente 0,1 ml de PPD en la zona rasurada
4. Medir el grosor del pliegue de la piel 72 horas ( $\pm 4$ ) tras la inoculación de la PPD con el mismo cutímetro que el primer día y valorar la presencia de signos clínicos. Para disminuir la subjetividad inherente a

la propia prueba, es importante que el veterinario que haya realizado la primera medición, sea también quien realice la segunda.

La prueba IDTB debe realizarse sobre la parte anterior de las tablas del cuello del animal porque esta región es más sensible y menos sucia que otras localizaciones utilizadas (Casal et al., 2015), lo que proporciona reacciones más marcadas y más fácilmente interpretables. Desde un punto de vista práctico el tercio anterior del cuello es el punto menos accesible para realizar la inoculación (el manejo del ganado es complicado, las mangas de contención no siempre son las más adecuadas ni seguras, la inoculación en esa posición requiere más tiempo, etc). A pesar de los inconvenientes que presenta esta localización, se ha demostrado que es más sensible al compararla con otras adyacentes (cuello posterior, zonas pre-escapular y escapular) por lo que al detectar más animales infectados que el resto se acorta el tiempo necesario para erradicar la enfermedad en la explotación, disminuyendo de manera paralela el coste necesario e incrementando la motivación tanto de los ganaderos como de los propios veterinarios. La interpretación de la prueba intradérmica se establece en base a un punto de corte obtenido al realizar la lectura empleando el cutímetro y/o presencia de signos clínicos. En función de la prevalencia y/o situación epidemiológica de la explotación, la interpretación puede ser estándar o severa (incrementando la sensibilidad o especificidad según se requiera). La prueba IDTB posee una buena sensibilidad (63% - 100%) para detectar la presencia de la infección a nivel de rebaño (de la Rua-Domenech, 2006; Schiller et al., 2011), disminuyendo su sensibilidad a nivel individual, el valor intermedio que se estima es del 84%. La especificidad de la prueba varía entre un 75% - 99%, considerándose como su valor medio el 97%.

## 2. Test de detección de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ )

De manera adicional a la prueba intradérmica en el ámbito de la normativa comunitaria y nacional se contempla el empleo del test de detección de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ). El empleo conjunto de ambas pruebas permite la detección del máximo número de animales infectados reduciendo así el

tiempo necesario para eliminar la infección en la explotación. Por este motivo, el empleo complementario de ambas pruebas se aplica en rebaños en los que previamente se haya confirmado la infección. Además, se ha descrito que el IFN- $\gamma$  es capaz de detectar animales en un estado precoz de la infección que no son detectados por la prueba cutánea (Gormley et al., 2006; Wood and Jones, 2001). Se asume por tanto que en general, la sensibilidad del IFN- $\gamma$  es superior a la de la IDTB (73% - 100%) con un valor intermedio de 92% y su especificidad varía entre 80% 99% (con un valor medio de 90%) (Schiller et al., 2010). El estatus del rebaño siempre será otorgado según los resultados de la prueba cutánea, si bien cualquier rebaño con animales positivos al IFN- $\gamma$  será considerado positivo. El test de detección de IFN- $\gamma$  debe realizarse por los laboratorios autorizados de acuerdo con el R.D. 2611/1996 y sus modificaciones posteriores, por el que se regulan los Programas Nacionales de Erradicación de Enfermedades Animales. Esta técnica debe realizarse en animales en los que no se haya aplicado la IDTB en un periodo mínimo de 60 días (Rothel et al., 1992), y para evitar falsos positivos no se realiza en animales menores de 6 meses. El fundamento de esta prueba es que al estimular in vitro la sangre procedente de animales infectados con la PPD los linfocitos responden produciendo IFN- $\gamma$  que se cuantifica mediante un ELISA tipo sándwich (Vordermeier et al., 2006; Wood et al., 1990). Para que los linfocitos produzcan IFN- $\gamma$  es esencial que se extremen las medidas tanto al realizar la recogida de la sangre, como en el transporte de la misma, para evitar que sufran cualquier daño que altere su viabilidad (las instrucciones del fabricante recomiendan que la estimulación de la sangre se realice antes de que pasen 8 horas tras su recogida). Asimismo, para que el resultado de esta prueba sea fiable es necesario que las PPDs empleadas al estimular la sangre estén en perfecto estado y tengan una potencia biológica adecuada; La sangre se estimula con las PPDs empleadas en la prueba intradérmica ajustando su concentración. También se han empleado cócteles proteicos que consisten en una mezcla antigénica (como por ejemplo ESAT-6, CFP-10 y Rv-3615c) para incrementar la especificidad de la prueba (Aagaard et al., 2010; Bezos et al., 2011). El test de detección de IFN- $\gamma$  se considera menos subjetivo que la prueba intradérmica ya que para determinar si un animal es positivo o negativo se establece un



## **Introducción**

punto de corte numérico. Los criterios de interpretación empleados para definir el punto de corte pueden variar en función de la situación epidemiológica de cada país, así como el tiempo transcurrido entre la recogida y la estimulación de la sangre.

### **1.5.2. Pruebas diagnósticas basadas en la respuesta inmune de base humoral**

Una herramienta diagnóstica adicional (no oficial) para el diagnóstico de la tuberculosis bovina son las pruebas destinadas a la detección de anticuerpos específicos. Estas pruebas presentan una sensibilidad muy variable 18% -93,1% (Waters et al., 2011a; Whelan et al., 2008) y en términos de especificidad generalmente por encima del 90% (Casal et al., 2014; McCallan et al., 2017; Waters et al., 2011a; Whelan et al., 2008). Debido a la evolución en la respuesta inmune que se produce en los animales infectados son pruebas que no detectan animales infectados recientemente, imposibilitando su uso en el marco de la Campaña Nacional de Erradicación. La principal ventaja que presentan son que al usarse de manera combinada con las pruebas IDTB se incrementa su sensibilidad (Casal et al., 2014; Casal et al., 2017; Waters et al., 2011a). Otra ventaja es que son capaces de detectar animales que se encuentran en estado de anergia y que no reaccionan a las pruebas de base celular (Waters et al., 2011a). Se ha descrito que los animales anérgicos presentan lesiones muy desarrolladas siendo los que excretan el bacilo en mayor cantidad (Pollock et al., 2005). Asimismo, a nivel de manejo de los animales los tests que detectan la respuesta humoral de los animales infectados son más prácticos que aquellos frente la respuesta celular, ya que no es necesario esperar un tiempo mínimo de desensibilización antes de realizar las pruebas.

### **1.5.3. Derivado proteico purificado**

El único producto aprobado actualmente para la detección de la respuesta inmune de base celular en los animales es el derivado proteico purificado,

también conocida como PPD (*Purified Protein Derivative*). Este producto, de casi 100 años de antigüedad, es el resultado de la investigación desarrollada por el Dr. Koch en 1890 quien introdujo el término tuberculina y las observaciones y posteriores mejoras de los Dres. Von Pirquet y Mantoux quienes evaluaron por primera vez la IDTB como una herramienta diagnóstica. En los años treinta del siglo pasado, la Dra. Seibert produjo una tuberculina de mayor pureza mediante técnicas de filtrado y precipitado de los componentes hidrosolubles de cultivos de *M. bovis* previamente crecidos y sometidos a un proceso de lisis y empleó el término de derivado proteico purificado (PPD) (Seibert, 1941). Desde entonces, el proceso de producción y, con ello, la composición final de la PPD ha cambiado muy poco. Las PPDs que se utilizan regularmente son la PPD bovina, que se obtiene a partir de *M. bovis*, y la PPD aviar, obtenida a partir de *M. avium*.

De acuerdo a la Farmacopea Europea, la PPD destinada para su empleo en animales mamíferos (PPDb) se define como una preparación de productos tratados térmicamente derivados del crecimiento y lisis de *M. bovis*. La PPDb se obtiene a partir de las fracciones hidrosolubles preparadas mediante un tratamiento térmico con vapor y posteriormente filtrado de cultivos de *M. bovis* previamente crecidos en medios líquidos sintéticos. La cepa de referencia para la PPD bovina es la AN5 de *M. bovis*, mientras que para la PPD aviar es la cepa D4ER de *M. avium* subsp. *avium*. La fracción activa del filtrado, fundamentalmente componentes de naturaleza proteica, se aísla mediante un proceso de precipitado, lavado y re-suspensión.

Antes de ser distribuido, el producto final se somete a un ensayo en el que se valora la potencia biológica, la seguridad y la especificidad comparándolos con una PPD de referencia. La medida de la actividad de las tuberculinas se establece mediante el valor de la potencia biológica, medida normalmente en Unidades Internacionales (*International Units*: IU). Según las recomendaciones de la OMS, una IU se define como la actividad contenida en 0,000028 mg del Estándar Internacional (International Standard, IS). En 1986, la OMS estableció oficialmente que la PPD de referencia era el IS, cuya potencia biológica se definió en 32.500 IU/ml, y que se encuentra disponible en el National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, Reino

Unido). En la actualidad es necesario que las tuberculinas aseguren al menos una potencia de 20.000 IU/ml 2.000 IU ( $\pm 25\%$ ) por inoculación], y en condiciones en las que se considere que la reactividad de los animales puede estar comprometida, se recomienda emplear dosis de hasta 5.000 IU por inoculación (OIE, 2009). El empleo en campo de una tuberculina con menor potencia biológica puede tener repercusiones negativas en el control de la tuberculosis bovina, ya que la respuesta celular originada en el hospedador podría ser menor, lo que aumentaría el riesgo de aparición de falsos negativos en las pruebas diagnósticas (Good et al., 2011). Sin embargo, el uso de una tuberculina con una potencia biológica demasiado elevada tiende a incrementar el número de reacciones falsas positivas producidas por infecciones por miembros del MAC y del grupo MOTT (Ritchie, 1959). Es por tanto de vital importancia desde el punto de vista del diagnóstico de la tuberculosis el empleo en campo de una tuberculina que garantice tanto la máxima sensibilidad como la máxima especificidad.

Es indudable el papel de las PPD en el control de la enfermedad; sin embargo, se ha llegado a un cuello de botella ya que, a pesar de su amplia utilización presenta algunos inconvenientes.

- **Composición de la PPD**

La PPD es el resultado de un proceso de purificaciones de las fracciones hidrosolubles de un cultivo de *M. bovis*. Está claro que existe una serie de factores que podrían influir en la composición del producto final, por ejemplo, la cepa utilizada, las condiciones de crecimiento y los procedimientos de precipitación y purificación empleados. Los avances en el campo de la proteómica en los últimos años han permitido identificar muchos de los componentes de las PPDs que se emplean actualmente en el diagnóstico de la tuberculosis (Borsuk et al., 2009; Cho et al., 2015; Yang et al., 2012).

En la actualidad existe una necesidad urgente de estandarizar la preparación de las tuberculinas, ya que tanto el sistema de producción como la composición del producto final varía entre proveedores (Yang et al., 2012). Se asume que, aunque diferentes lotes de PPDs puedan inducir similares respuestas DTH en los animales, las reacciones locales inducidas podrían

presentar características diferentes a nivel histológico, lo que sugiere una correlación entre la histopatología y la presencia de ciertos tipos de proteínas en las diferentes PPD, derivadas del proceso de obtención (Cho et al., 2012).

- **Estandarización del producto final:**

A pesar de que los fabricantes de la PPDb siguen las indicaciones de la Farmacopea y la OIE, el contenido proteico presente en la PPD no siempre es constante y no se correlaciona con la actividad biológica de la misma. La naturaleza del producto y los propios procesos de producción hacen imposible implementar un proceso de control completo sobre su composición final, y, por tanto, hacen imposible la comparación de diferentes PPDs e incluso, diferentes lotes de la misma PPD mediante los métodos analíticos tradicionales. Por ello, para evaluar la potencia biológica de las tuberculinas *in vivo*, la OMS dictaminó que los ensayos biológicos debían realizarse en cobayas infectadas de forma experimental. En las pruebas de potencia *in vivo* además de comparar la respuesta DTH producida por tuberculinas de distintos fabricantes entre si y respecto al IS, es necesario que todas las tuberculinas obtengan una potencia biológica entre el 66% y el 150% de la que viene declarada en su etiqueta (según el fabricante), garantizando así que son aptas para su empleo en los saneamientos en campo. La propia definición de UI descrita anteriormente pone de manifiesto las dificultades que existen en conseguir un producto final bien definido. Además, la evaluación de la potencia de cada lote realizada mediante ensayos biológicos en cobayas, es muy difícil de estandarizar y está, por tanto, sujeto a errores.

Por otra parte, y de acuerdo con la recomendación de la Unión Europea (Directiva Europea 2010/63/EU) sobre la protección de animales para fines científicos, se están realizando estudios para tratar de desarrollar una técnica *in vitro* alternativa a los ensayos *in vivo* con animales infectados o sensibilizados con *M. bovis* para la determinación de la potencia biológica de las PPDs. Una alternativa es realizar la titulación de las tuberculinas *in vitro*. Si se lograra reproducir en la alícuota de sangre la misma respuesta que se obtiene en piel en la IDTB sería posible validar la potencia biológica de las PPDs sin necesidad de experimentar con animales *in vivo* (Schiller et al., 2010).

- **Actividad biológica:**

Los miembros del género *Mycobacterium* presentan una alta similitud genética e inducen una respuesta inmune similar en los hospedadores infectados. La PPD<sub>b</sub> es una preparación compleja compuesta por cientos de antígenos diferentes y componentes inmunoactivos (Yang et al., 2012). Muchos de estos componentes tienen homólogos en otras especies de micobacterias. Estudios recientes han demostrado que gran parte del contenido proteico de la PPD<sub>b</sub> estaba formado por proteínas de choque térmico (HSP, *Heat Shock Proteins*): GroEL, GroEs, DnaK y HspX (Borsuk et al., 2009; Cho et al., 2015). Estas proteínas están presentes en otras micobacterias y presentan una homología mayor de 70% (Borsuk et al., 2009; Cho et al., 2015) representando la explicación más probable al alto porcentaje de resultados falsos positivos, particularmente evidentes en casos de coinfecciones con otras micobacterias o en situaciones de vacunación frente a micobacterias. Ambas situaciones provocan la aparición de falsos positivos y se atribuyen a la sensibilización de los animales con antígenos homólogos presentes en micobacterias no tuberculosas y cepas vacunales. Por otro lado, existe el problema de los resultados falsos negativos, particularmente importante en los animales jóvenes y los sujetos inmunocomprometidos (como hembras en el periodo de parto y animales en los últimos estadios de infección). En estos casos, la respuesta de hipersensibilidad retardada no es eficiente lo que conlleva un error en la identificación de los animales infectados permitiendo que permanezcan en el rebaño constituyendo una posible fuente de infección para otros sujetos susceptibles.

### 1.5.4. Concepto de anergia

En el desarrollo de la respuesta inmunológica del animal infectado es muy importante resalta el concepto de anergia. Este término se ha definido como aquel estado en el cual un animal infectado no responde a las pruebas diagnósticas de base celular (Lepper et al., 1977), aunque podría presentar niveles detectables de anticuerpos circulantes. Por tanto, sería negativo a las pruebas de base celular pero positivo a las pruebas de base humoral (Neill et

al., 1994). El mecanismo exacto mediante el que ocurre este fenómeno es desconocido, aunque parece estar relacionado con niveles elevados de IL-10, que inhibe los linfocitos T y disminuye la producción de IFN- $\gamma$  (Boussiotis et al., 2000).

Es un fenómeno que se ha descrito sobretodo en fases avanzadas de la enfermedad, cuando los animales presentan lesiones tuberculosas extensas (Waters et al., 2006), en situaciones de agotamiento del sistema inmune (de la Rua-Domenech, 2006), debido a infecciones concomitantes como la diarrea vírica bovina (BVD) u otras enfermedades (Monies and Head, 1999) y cuando el sistema inmune del hospedador está comprometido, como por ejemplo en animales de edad avanzada (Brooks-Pollock et al., 2013) y en casos de malnutrición (Francis, 1947). En animales de elevada producción, la anergia se puede relacionar con situaciones de estrés (el transporte o el manejo), el desequilibrio metabólico postparto (Kehrli et al., 1989) y también se ha descrito en situaciones puntuales debido a un tratamiento sistémicos con corticosteroides (Doherty et al., 1995). Desde un punto de vista epidemiológico es esencial detectar los animales anérgicos, ya que al no reaccionar a las pruebas diagnósticas de base celular permanecen en la explotación y podrían constituir fuente de infección para los animales sanos (McNair et al., 2007; Pollock et al., 2005).

La anergia es por tanto un fenómeno difícil de caracterizar, ya que sería necesario realizar de forma paralela a la prueba diagnóstica un análisis mediante el cual se pueda asegurar que la respuesta celular desarrollada en el hospedador no es competente. No se debe confundir el término de anergia con el concepto de falso negativo, que puede aparecer en las pruebas de base celular debido a limitaciones inherentes a las mismas, o a una incorrecta interpretación y/o realización.

### 1.6. Herramientas disponibles para la descripción de las proteínas inmunogénicas

#### 1.6.1. Importancia de la proteómica en las enfermedades infecciosas

La mayoría de las enfermedades infecciosas son la consecuencia de una compleja red de interacciones que pueden implicar de cientos a miles de factores, tanto del patógeno como del hospedador. Para alcanzar un mejor entendimiento de los procesos de las enfermedades infecciosas es esencial realizar estudios traslacionales y multidisciplinarios.

Los análisis más exhaustivos realizados hasta el momento en cuanto a la búsqueda de biomarcadores y nuevas dianas para fármacos y vacunas se han realizado a partir de estudios en genómica y transcriptómica. En las últimas décadas ha aumentado significativamente el número de estudios proteómicos en enfermedades infecciosas y en todo el ámbito clínico para la búsqueda de biomarcadores y nuevas dianas para la vacunación y fármacos.

La proteómica es una rama de la genómica que estudia los proteomas, conjunto de proteínas que se expresan a partir del genoma de un organismo (Wilkins et al., 1996). Así, la proteómica se encarga de la identificación de las proteínas, estructura primaria (secuencia de a-a), identificación de sus modificaciones postraduccionales, localización y cuantificación de la expresión proteica (Aebersold, 2003; Steen et al., 2004).

La proteómica es considerada el siguiente paso en el estudio de un sistema biológico, después de la genómica y transcriptómica. La complejidad de los estudios proteómicos es mayor, ya que el genoma de un organismo es estático, mientras que el proteoma difiere de una célula a otra y entre estados. Además, las proteínas pueden experimentar modificaciones en su estructura o secuencia básica (p.ej., el procesamiento proteolítico) y modificaciones postraduccionales (PTM), que sirven para modificar o modular la actividad, función o localización de una proteína en diferentes contextos fisiológicos o metabólicos. Finalmente, otro factor de complejidad

es el moonlighting o multifuncionalidad, en que una misma proteína puede realizar varias funciones (Jeffery, 2009).

Las interacciones entre el hospedador y el patógeno reflejan el equilibrio de los mecanismos de defensa de aquel y la virulencia de este. Con los avances de la tecnología proteómica es posible caracterizar la interacción patógeno- hospedador. Se han publicado estudios proteómicos para distintos patógenos: *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella Typhimurium*, *Streptococcus neumoniae* o *Yersinia pestis*, entre otros (Lee et al., 2008; Wu et al., 2008; Zhang et al., 2005).

### 1.6.2. Metodología proteómica

La principal herramienta de la investigación proteómica es la espectrometría de masas (EM), una tecnología que incluye la instrumentación (espectrómetros de masas), métodos de adquisición y software de análisis de datos. Los espectrómetros de masas constan de tres componentes fundamentales: la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector (Siuzdak et al., 1996; Steen et al., 2004). La EM es una técnica analítica que mide la relación masa/carga (ratio  $m/z$ ) de una molécula y se utiliza para la detección e identificación de moléculas pequeñas.

Hay una gran variedad de métodos, reactivos, instrumentación y herramientas informáticas disponibles para el diseño, la realización y el análisis de datos de experimentos proteómicos (Pandey and Mann, 2000; Stults and Arnott, 2005). En general, dichos experimentos suelen consistir en cuatro etapas básicas: 1) preparación de la muestra, 2) fraccionamiento de la muestra, 3) análisis por EM y 4) análisis informático de los datos.

#### Preparación de la muestra

La obtención y preparación de las muestras es uno de los pasos más relevantes en los estudios proteómicos, especialmente para evitar o minimizar la contaminación por proteínas indeseables. Por ello, la muestra debe ser



## Introducción

manejada con el máximo cuidado para evitar cualquier contaminación, sobre todo por queratina humana, proteína contaminante que con mayor frecuencia se encuentra en los análisis proteómicos.

Es de vital importancia que las muestras sean tomadas y procesadas mediante el mismo protocolo para que los resultados obtenidos sean veraces, reproducibles y que las diferencias observadas no sean fruto de la manipulación.

El origen de la muestra utilizada en un experimento proteómico puede ser muy diverso y las fuentes desde las que extraer proteínas muy diferentes. El procesamiento de la muestra en el laboratorio difiere según la procedencia de esta y la finalidad del estudio. La preparación de la muestra comienza con el cultivo o el lisado de células, homogenizando tejidos u obteniendo fluidos corporales para la extracción de las proteínas presentes. Las proteínas extraídas son desnaturalizadas y modificadas químicamente para solubilizarlas y preveer así la agregación y la actividad proteasa que pueda presentar la muestra.

### **Separación de proteínas**

En los estudios en proteómica, la muestra es una mezcla compleja de cientos/miles de proteínas. Por este motivo es esencial la utilización de una técnica de separación. Estas técnicas se agrupan en: en gel y gel-free. Las técnicas en gel son aquellas en las que se utiliza un entramado de polímeros para la separación. Las técnicas gel-free realizan la separación de la muestra proteica en solución mediante diferentes tipos de cromatografía líquida (intercambio iónico, afinidad, fase reversa...).

#### **- En gel**

La electroforesis sigue siendo una herramienta fundamental para la separación de proteínas, permitiendo la separación de las proteínas por propiedades como el tamaño ( $M_r$ ), el punto isoelectrico ( $pI$ ) y/o la conformación (geles nativos). En función de la complejidad de la muestra, la separación en gel se puede realizar por una sola propiedad (monodimensional) o por 2 propiedades consecutivas (bidimensional). Esta

última es la más adecuada para la separación de extractos proteicos totales debido a su complejidad. En la electroforesis bidimensional (2DE), las proteínas son fraccionadas respecto a sus puntos isoeléctricos y sus pesos moleculares mediante una primera etapa de enfoque isoeléctrico (IEF, *Iso-electric focussing*) seguida de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*). Aquellas que presentan interés pueden ser detectadas en el gel mediante distintas técnicas de tinción, extraídas del mismo y preparadas para su identificación mediante análisis de EM (Rabilloud et al., 2010).

La preparación de la muestra para la electroforesis bidimensional es crucial para la obtención de resultados óptimos, siendo necesarios procesos de solubilización, disgregación, desnaturalización y reducción de las proteínas (Gorg et al., 2000).

La 2DE presenta diversas ventajas entre las que destaca la posibilidad de visualizar directamente el mapa de proteínas del proteoma estudiado, a diferencia de los métodos de fraccionamiento cromatográfico. Esto permite la fácil identificación de isoformas proteicas y sus modificaciones postraduccionales, así como la comparación con otros mapas proteicos. Una desventaja importante de la técnica 2DE es la limitación en la capacidad de enfoque de proteínas de media a baja abundancia debido a la gran gama de niveles de expresión de proteínas. Las proteínas más afectadas por dicha limitación son las proteínas de membrana y proteínas de bajo peso molecular, que se encuentran subrepresentadas en proteomas totales.

### - Libre de gel

En técnicas libre de gel las proteínas presentes en la muestra son normalmente digeridas antes de ser separadas mediante cromatografía líquida por diferentes propiedades. La cromatografía líquida empleada depende de la columna utilizada, siendo las más frecuentes las de fase reversa, intercambio iónico, afinidad y exclusión molecular. Posteriormente se realiza un análisis mediante EM en tándem para la identificación de las proteínas (LC-MS/MS).

Las técnicas de separación libre de gel son aconsejables cuando la cantidad de muestra es escasa. Esta técnica permite la detección de

## Introducción

proteínas difícilmente separables en 2DE, como proteínas muy hidrofóbicas, proteínas de membrana y proteínas con  $pI$  o  $M_r$  extremos, como son las proteínas ribosomales con un  $pI$  básico (Duncan, 2007; Standing, 2003). La razón reside en que en la 2DE las proteínas se separan para ser posteriormente digeridas, mientras que en la cromatografía son primero digeridas a péptidos y después fraccionadas. Sin embargo, la detección de isoformas y modificaciones postraduccionales resulta más complicada.

### Identificación de proteínas por espectrometría de masas

La espectrometría de masas es un método analítico utilizado para medir la relación de la masa frente a la carga de las moléculas (ratio  $m/z$ ). Esta medida se lleva a cabo mediante ionización de las moléculas, separación de los iones resultantes de acuerdo con su relación masa/carga, y detección de las abundancias de los mismos.

Como se ha comentado anteriormente, todos los equipos de EM están compuestos por una fuente de iones, un analizador de masas y un detector. Estos componentes pueden combinarse en distintas configuraciones con el fin de crear espectrómetros con distintas especificidades y prestaciones (Aebersold and Mann, 2003; Domon and Aebersold, 2006).

Existen principalmente dos **técnicas de ionización**, las técnicas de ionización por electrospray (ESI, *Electrospray Ionization*) o la ionización por desorción con láser asistida por matriz (MALDI, *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization*). Una fuente ESI ioniza por electronebulización moléculas disueltas en fase líquida, dando lugar a un haz de iones extremadamente fino que se enfoca directamente hacia el analizador de masas. En contraste con ello, en la técnica MALDI los analitos se co-cristalizan con una molécula orgánica de bajo peso molecular denominada matriz, y en esta propia fase sólida son ionizados por la acción de pulsos de luz láser. Los iones resultantes de uno u otro proceso pasan al analizador de masas

Una vez en el **analizador de masas**, los iones son separados en función a su relación  $m/z$ . Los analizadores de masas usados con más frecuencia son el cuadrupolo (Q, *Quadrupole*), el de tiempo de vuelo (TOF, *Time-Of-Flight*),

de trampa iónica (IT, *Ion Trap*), de resonancia ciclotrónica de iones con Transformada de Fourier (FTICR, *Fourier transform ion cyclotron resonance*) o de trampa orbital (Orbitrap), y pueden utilizarse tanto individualmente como en tándem. Los analizadores de masas en tándem (MS/MS) llevan a cabo múltiples pasos de análisis mediante distintos analizadores individuales separados en el espacio o en el tiempo. En la MS/MS separada en el espacio, los analizadores están físicamente separados pero conectados entre sí para mantener el vacío a lo largo de todo el recorrido de los iones. Este tipo de configuraciones se observa en instrumentos como el Q-TOF, TOF-TOF o QqQ (o triple cuadrupolo). Por otra parte, en la MS/MS separada en el tiempo los iones son atrapados en una misma cámara con distintas etapas de análisis a lo largo del tiempo. Este tipo de procesos se pueden llevar a cabo con analizadores tipo IT, FTICR u Orbitrap. Por último, desde el o los analizadores de masas, los iones entran en el **detector**, encargado de medir la abundancia de cada ion con relación  $m/z$  específica.

De todas las combinaciones posibles de fuente de ionización y analizador de masas, existen principalmente dos aproximaciones. Las proteínas separadas en un gel bidimensional suelen identificarse a partir de su huella peptídica obtenida por MALDI-TOF. En este proceso, la banda o spot de gel que contiene una única proteína se digiere enzimáticamente con una proteasa, generalmente tripsina, para obtener una mezcla de péptidos. Los péptidos son analizados en el espectrómetro de masas originando un espectro de masas característico de cada proteína (huella peptídica) formado por ratios  $m/z$  que posteriormente son utilizados para realizar una búsqueda en las bases de datos y obtener su identificación. Si la huella peptídica no es suficiente para identificar la proteína, se puede analizar por MS/MS que permite secuenciar uno o varios de los péptidos que identifican de manera inequívoca a la proteína (Thiede et al., 2005).

Por otro lado, la combinación de la cromatografía líquida (LC, *liquid chromatography*) y la MS/MS es una aproximación multidimensional que permite la identificación de las proteínas que componen un proteoma de una manera más profunda y con un mayor rango dinámico y precisión. En este caso, una mezcla compleja de proteínas se digiere con una proteasa que

## Introducción

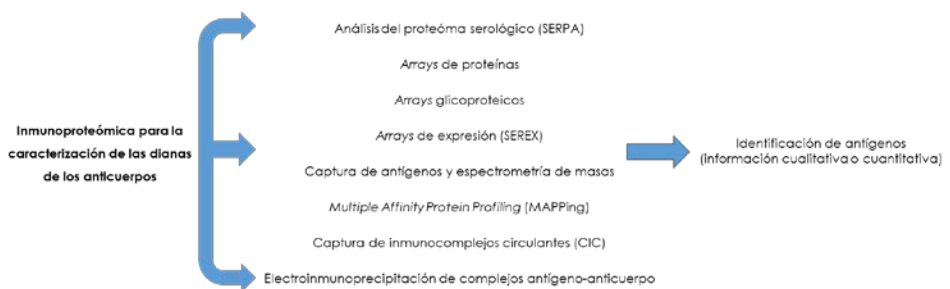
suele ser la tripsina y la mezcla de péptidos obtenida se fracciona mediante HPLC antes de ser analizada mediante MS/MS. Estos dos sistemas suelen estar conectados en línea de manera que los eluidos del HPLC fluyen directamente dentro de la fuente de ESI. El espectrómetro de masas en tándem adquiere primero un espectro de masas de la mezcla de péptidos, de la que aquellos de mayor intensidad se seleccionan para su fragmentación, obteniendo así un espectro de fragmentación (o espectro de MS/MS). La información procedente tanto del primer espectro MS como del de fragmentación o MS/MS puede ser usada para identificar a las proteínas presentes en la mezcla (Nesvizhskii, 2007). Los espectrómetros de masas en este caso suelen ser el Q-TOF, TOF-TOF, QqQ, IT, FTICR u Orbitrap.

### 1.6.3. Metodología inmunoproteómica

El sistema inmunológico adaptativo está determinado por los péptidos procedentes de patógenos presentados por las células inmunológicas. La identificación de estos péptidos o proteínas se pueden investigar utilizando numerosos enfoques del campo de la proteómica. Como una extensión de la proteómica, el término inmunoproteómica se utilizó por primera vez en 2001 (Jungblut, 2001). Este campo incluye una gran variedad de técnicas que resultan en la identificación de proteínas y péptidos relacionadas con el sistema inmune que derivan de patógenos externos, células del hospedador o moléculas de señalización del sistema inmune. El estudio de los antígenos no es nuevo y se han aplicado métodos clásicos (ELISA, Western-blotting o aglutinación) para estudiar la respuesta inmune frente a la vacunación o al desarrollo de una enfermedad. Sin embargo, en muchas de estas técnicas, la identificación de dicho antígeno ha supuesto un cuello de botella. Por ello, recientes avances en genómica y proteómica, incluido el desarrollo en espectrometría de masas, ha producido un gran avance en los métodos inmunoproteómicos.

## Técnicas inmunoproteómicas para la caracterización de las dianas de los anticuerpos:

Una de las dos principales armas de las que dispone el sistema inmunitario para la defensa del organismo es la respuesta humoral, que consiste en células B activadas que secretan una gran cantidad de anticuerpos muy específicos que se unen a los microorganismos o células diana para neutralizarlos o marcarlos para su eliminación. Se han desarrollado numerosos métodos para estudiar las dianas de los anticuerpos generados en la respuesta humoral; los más utilizados se describen a continuación.



**Figura 13.** Perspectiva general de los métodos más utilizados para identificar las dianas de la respuesta inmune humoral. Adaptado de Fulton and Twine, 2013.

### 1. Inmunoproteómica clásica: análisis del proteoma serológico

Uno de técnicas más utilizadas en inmunoproteómica es la electroforesis en geles 2D-PAGE, que separa las proteínas basándose en características físicas ortogonales. Cuando se combina con el Western-blotting la técnica se conoce como Análisis del proteoma serológico o SERPA (*SERological Proteome Analysis*) (Farrell and Burns, 1975).

El uso de los geles 2D-PAGE, presenta una serie de desventajas como las dificultades asociadas a la resolución de proteínas grandes o pequeñas, hidrofóbicas o básicas, además el rango dinámico (posibilita identificar proteínas de abundancia muy baja en presencia de proteínas de abundancia muy alta) no es muy elevado. A pesar de ello, una de las principales ventajas que presenta es la facilidad y la eficacia con la que los geles 2D-PAGE se pueden combinar con otras técnicas, como el Western-

## Introducción

blotting. Cuando se combina con el WB para la detección de antígenos proteicos, y la espectrometría de masas para la identificación de las proteínas a partir de la digestión del gel, esta metodología proporciona una herramienta poderosa para la identificación de antígenos. Los geles 2D-PAGE separan la mayoría de las proteínas de una muestra a un solo punto o “spot” de proteína, a partir del cual se puede identificar dicho antígeno. Los geles son entonces transferidos a membranas y se lleva a cabo un western blot tradicional incubándolo con sueros humanos o de animales. Se pueden realizar varios geles en paralelo, uno como referencia de los antígenos que inducen una respuesta inmune humoral en el WB y otro que permitirá cortar el punto de proteína para posteriormente identificarlo mediante espectrometría de masas (Fulton and Twine, 2013).

Este método clásico de inmunoproteómica se sigue utilizando ampliamente y proporciona una forma de realizar un cribado de la reactividad de los anticuerpos del suero en una gran variedad de estados de enfermedad o post-vacunación. Se ha aplicado para el descubrimiento de nuevos antígenos proteicos, biomarcadores de enfermedad o correlacionarlos con niveles de protección, en muchas enfermedades bacterianas como fiebre Q (Xiong et al., 2012) o *Helicobacter pylori* (Lahner et al., 2011; Lahner et al., 2010).

## 2. Arrays de proteínas

Algunas de las limitaciones de los geles 2D-PAGE se han solventado con el desarrollo de arrays de proteínas para el estudio de la respuesta inmune humoral. En este caso, cada *Open Reading Frame* de interés en el genoma se expresa en forma de proteína recombinante y se fija en el microarray de proteínas. Los proteomas de las bacterias son los suficientemente pequeños que permiten que todas las proteínas contenidas en el genoma se estudien en un solo array (Fulton and Twine, 2013).

Los chips son tratados de forma similar a un WB tradicional, enfrentándolo a un suero procedente de un animal/humano enfermo y la reactividad se detecta tras la incubación con un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo. La principal ventaja radica en que se puede

estudiar el proteoma teórico completo de un microorganismo y se reduce el volumen de suero utilizado para el cribado (2 µl vs 50-100 µl en 2D-Western blotting).

Sin embargo, la complejidad de expresar todas las proteínas recombinantes y su posterior purificación puede suponer un reto para producir microarrays de proteínas que contengan todo el proteoma de un microorganismo. Además, la expresión de las proteínas no contiene las modificaciones postraduccionales de la proteína nativa y el procesamiento y el correcto plegado de la proteína no está garantizado (Fulton and Twine, 2013).

Los arrays de proteínas se han utilizado para estudiar la respuesta humoral de una gran variedad de patógenos, entre ellos infecciones por *Chlamydia* (Cruz-Fisher et al., 2011), brucelosis (Cannella et al., 2012), *M. tuberculosis* (Kunnath-Velayudhan et al., 2010) o salmonelosis (Lee et al., 2012) entre otros.

### 3. Antígenos glicoproteicos

Se está demostrando cada vez más que las glicoproteínas tienen funciones en diversas enfermedades, incluido el cáncer o infecciones bacterianas. La glicosilación de proteínas es una modificación postraduccional muy común y una glicosilación incorrecta de las proteínas puede llevar al desarrollo de enfermedades autoinmunes (Coenen et al., 2007; Hiki, 2009).

Recientemente, se ha descrito un sistema que permite el cribado de grandes bibliotecas de glicopéptidos. Este sistema consiste en la síntesis química de un péptido que se inmoviliza en un chip de microarrays y posteriormente se lleva a cabo una glicosilación in situ del mismo. Ya que la diversidad de carbohidratos en el dominio Bacteria es mayor que en los eucariotas, muchos azúcares son reconocidos por el sistema inmune durante la infección. Por ello, se ha incrementado los estudios del papel que las glicoproteínas bacterianas juegan tanto en la respuesta inmune innata (Verma et al., 2005) como adaptativa (Doig et al., 1996).



### 4. Arrays de expresión

Los arrays de expresión están formados por cDNA de bacterias, levaduras o mamíferos que se utilizan para la detección de nuevos antígenos. La técnica se conoce como SEREX (*Serological analysis of recombinant cDNA expression libraries*), a la que se acuña también el término de “proteómica reversa” por su gran componente genético. La gran ventaja que supone este enfoque es la identificación de antígenos que se están expresando in vivo (Lee and Jeoung, 2007).

A pesar de las ventajas, SEREX presenta algunos retos, siendo los más importantes el tiempo que lleva la construcción de las librerías de cDNA y la aparición de falsos positivos debido a la reactividad con componentes del sistema de expresión o la ausencia de modificaciones postraduccionales en sistemas procariotas de expresión (Fulton and Twine, 2013).

### 5. Captura de antígenos y espectrometría de masas:

La espectrometría de masas por inmunocaptura tiene como objetivo enriquecer las proteínas antigénicas de los lisados celulares, utilizando la espectrometría de masas como el medio final para identificar las proteínas capturadas. Existen numerosas variantes de este método y generalmente se utilizan inmunoglobulinas procedentes de sueros de pacientes inmovilizados en Proteína A o Proteína G fijadas en columnas. A continuación, se pasa un lisado celular por la columna y los antígenos frente a los que el paciente ha generado anticuerpos son capturados. Las proteínas eluidas de la columna son digeridas por enzimas e identificadas mediante MS/MS. A continuación, se describen algunos ejemplos.

- *Multiple Affinity Protein Profiling:*

Un ejemplo de inmunocaptura es la técnica llamada MAPPING (*Multiple Affinity Protein Profiling*) que se ha utilizado para la identificación de antígenos en cánceres (Hardouin et al., 2007a; Hardouin et al., 2007b). Está basada en cromatografía de afinidad en dos dimensiones, donde en una primera fase se separa un lisado tumoral utilizando sueros de pacientes sanos para eliminar autoantígenos procedentes de pacientes sanos y en una segunda fase con

inmunoglobulinas de pacientes enfermos de cáncer para la identificación de antígenos cancerígenos específicos. Las proteínas eluidas en esta segunda fase son identificadas por MS/MS.

- *Captura e identificación de inmunocomplejos circulantes:*

Los inmunocomplejos se forman mediante interacción no covalente entre antígenos y anticuerpos, que son eliminados por fagocitos mononucleares mediante receptores del complemento y receptores del fragmento Fc (Roozendaal and Carroll, 2007). Diversos estudios han demostrado que el complejo antígeno-anticuerpo juegan un papel muy importante en la progresión de enfermedades autoinmunes (Solomon et al., 2005), cáncer (Croce et al., 1985) y enfermedades infecciosas (Liu et al., 2011). Estos inmunocomplejos pueden ser aislados del suero como describieron en (Ohyama and Kuroda, 2012).

### **Inmunoproteómica en el estudio de los péptidos del complejo mayor de histocompatibilidad:**

La inmunidad mediada por células de la respuesta inmune adaptativa implica la activación de poblaciones celulares como fagocitos o células T en respuesta a antígenos extraños. Las células T reconocen antígenos presentados a unas moléculas existentes en la superficie de células del hospedador en unos complejos llamado complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Los antígenos que se unen al CMH son pequeños péptidos que proceden de la proteólisis de proteínas. Existen dos subgrupos principales del CMH, llamados CMH tipo I y tipo II.

El CMH tipo I se encuentra en todas las células nucleadas y es reconocido por células T citotóxicas. El CMH tipo II solo se encuentran en células presentadoras de antígenos y el reconocimiento del antígeno en el CMH tipo II que resulta en la activación de células T. Para ambos tipos de CMH los antígenos son fragmentos que son reconocidos por las células T que se conocen como epítopos de células T.

La identificación y caracterización de péptidos que actúan como epítopos específicos de células T son esenciales para los estudios

## Introducción

inmunológicos, tanto en investigación básica como aplicada, por ejemplo, para el desarrollo de vacunas que induzcan una respuesta de base celular. La identificación de estos epítomos se ha aplicado técnicas de inmunoproteómica directa y reversa así técnicas de espectrometría de masas (Fulton and Twine, 2013).

Aunque se han llevado a cabo la elución de los péptidos unidos al CMH de la superficie de las células mediante tratamiento con ácidos (Storkus et al., 1993), la metodología aplicada en la identificación de epítomos T consiste en una primera purificación del complejo CMH-peptido, a partir de un lisado celular, mediante inmunopurificación con anticuerpos monoclonales anti-CMH. A continuación, se produce la elución de los péptidos del CMH y posterior separación mediante cromatografía de exclusión molecular (corte de 3-5 kDa). Una vez purificados los péptidos asociados al CMH se identifican mediante espectrometría de masas (Demine et al., 2003). Esta metodología ha sido descrita para identificar epítomos T de *Plasmodium falciparum* (Carralot et al., 2008), cáncer (Hawkins et al., 2008) o artritis reumatoide (Seward et al., 2011).

Por tanto, a pesar de los enormes avances que ha habido en las dos últimas décadas, sería necesario profundizar en la investigación para continuar la mejora tanto de los reactivos utilizados como de la estrategia de diagnóstico de tuberculosis con el fin último de alcanzar el control de la enfermedad y su erradicación en los entornos en los que sea posible.

La identificación de nuevos antígenos con alta capacidad inmunogénica que permitan un diagnóstico sensible y específico de la tuberculosis tanto en animales como en el hombre debe ser un objetivo prioritario, especialmente en aquellos países donde la prevalencia es más elevada, así como paralelamente si es posible el estudio del potencial inmunogénico y protector que eventualmente puede tener alguno de ellos y de esta forma confluir con la aspiración inicial de Robert Koch cuando diseñó la tuberculina. Los objetivos de esta tesis doctoral pretenden aportar conocimiento sobre la búsqueda de nuevos candidatos para el diagnóstico de tuberculosis y el papel de la respuesta inmune humoral orientada al diagnóstico serológico multiespecie.

## **2. Justificación, objetivos y organización de la tesis**



## 2. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

### JUSTIFICACIÓN

A pesar de los avances que se han producido en esta centuria, todavía no disponemos del reactivo perfecto para el diagnóstico de la tuberculosis en todos los animales susceptibles a la enfermedad.

La complejidad de la respuesta inmune frente a tuberculosis y las reactividades cruzadas en las técnicas de diagnóstico con micobacterias no tuberculosas y otras bacterias, hacen que el diagnóstico de tuberculosis presente ciertas limitaciones (Downs et al., 2018; Yang et al., 2012). Actualmente y con el fin de detectar el mayor número de animales infectados se presta especial atención al papel de la respuesta inmune humoral para la detección de animales en estado de anergia que escapan a las pruebas oficiales de diagnóstico (Casal et al., 2014; Casal et al., 2017; Waters et al., 2017). Sin embargo, los antígenos utilizados en las pruebas serológicas no presentan una adecuada sensibilidad y por ello es necesaria la identificación y caracterización de nuevos antígenos específicos para maximizar la detección de animales infectados minimizando el sacrificio innecesario de animales (Lyashchenko et al., 2017).

Para alcanzar este objetivo, las nuevas herramientas en proteómica e inmunoproteómica se han convertido en técnicas de elección para la identificación de aquellas proteínas con alta capacidad inmunogénica en distintos grupos bacterianos, incluidas las bacterias pertenecientes al MTBC.

### OBJETIVOS

El **objetivo principal** de la presente tesis doctoral es **mejorar el diagnóstico de la tuberculosis en los animales** mediante el estudio de los derivados proteicos de *M. bovis*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *C. pseudotuberculosis*. Con la información generada se tratará de obtener y purificar un producto antigénico específico de *M. bovis* y el desarrollo de una técnica serológica multiespecie como nueva estrategia de diagnóstico. La

## Justificación, objetivos y organización de la tesis

consecución de este objetivo general se pretende llevar a cabo mediante los siguientes **objetivos específicos**:

1. Identificación mediante anticuerpos monoclonales de proteínas inmunogénicas comunes y no comunes a la PPD<sub>b</sub> y PPD<sub>a</sub>; PPD<sub>b</sub> y derivado proteico de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y PPD<sub>b</sub> y derivado proteico de *C. pseudotuberculosis* y PPD<sub>b</sub>.
2. Obtención a partir de la PPD<sub>b</sub>, mediante técnicas cromatográficas, de antígenos específicos de *M. bovis*.
3. Identificación de los proteomas del derivado proteico purificado de *M. bovis* (PPD<sub>b</sub>), de *M. avium* (PPD<sub>a</sub>).
4. Identificación de las proteínas comunes entre PPD<sub>b</sub> y PPD<sub>a</sub> que pudieran estar implicadas en los fenómenos de reactividad cruzada en las pruebas de diagnóstico de la tuberculosis.
5. Desarrollo de nuevos ensayos serológicos multiespecie para el diagnóstico ante-mortem y post-mortem de la tuberculosis en animales domésticos y salvajes.

## ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

La presente tesis doctoral se ha estructurado en tres capítulos, cada capítulo a su vez dividido en distintos estudios experimentales con un total de cinco para lograr alcanzar los objetivos específicos.

**Capítulo I:** caracterización inmunoproteómica de la PPD<sub>b</sub> y análisis de las proteínas responsables de su reactividad cruzada. El capítulo I se ha dividido en dos estudios experimentales para la consecución de dos objetivos específicos.

- Estudio 1: análisis inmunoproteómico de la PPD<sub>b</sub>.
- Estudio 2: análisis inmunoproteómico de *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *C. pseudotuberculosis*.

**Capítulo II:** caracterización proteómica de la PPD<sub>b</sub> y PPD<sub>a</sub> e identificación de antígenos específicos para el serodiagnóstico de la tuberculosis en los

animales. El capítulo II incluye un estudio experimental para la alcanzar dos objetivos específicos.

- Estudio 3: caracterización proteómica de la PPD<sub>b</sub>, PPD<sub>a</sub> y de los antígenos purificados a partir de ellos.

**Capítulo III:** desarrollo de nuevos ensayos para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. El capítulo III engloba un objetivo específico que ha servido para la realización de dos estudios experimentales.

- Estudio 4: evaluación y validación de inmunoensayos.
- Estudio 5: validación de un ELISA indirecto multiespecie basado en los antígenos purificados para el diagnóstico de la tuberculosis en especies domésticas y salvajes.





### **3. Estudios experimentales**



### 3. ESTUDIOS EXPERIMENTALES

#### 3.1. Capítulo I: Caracterización inmunoproteómica de la PPD<sub>b</sub>.

#### Análisis de las proteínas responsables de su reactividad cruzada.

##### Estudio 1: análisis inmunoproteómico de la PPD<sub>b</sub>

Las pruebas oficiales de diagnóstico de la tuberculosis, tanto la IDTB como la detección del IFN- $\gamma$ , se basan en la utilización como antígeno de un reactivo, la PPD<sub>b</sub>. Este mismo reactivo ha sido profusamente en distintos ensayos serológicos (Bezoz et al., 2014a).

La PPD<sub>b</sub>, según la Farmacopea Europea es una preparación de productos tratados térmicamente derivados del crecimiento y lisis de *M. bovis*. Se obtiene a partir del crecimiento, inactivación térmica, filtración y precipitación con ácido tricloroacético de cultivos de *M. bovis* AN5. Durante la producción de la PPD<sub>b</sub>, las proteínas sufren procesos de degradación y agregación (Ho et al., 2006), dando lugar a una mezcla compleja de proteínas y péptidos solubles desnaturalizados, que dificulta la estandarización del producto y la definición molecular de sus componentes mediante los métodos tradicionales de identificación de proteínas (SDS-PAGE o 2D PAGE). A pesar de ello, se han descrito por espectrometría de masas los proteomas de las PPD<sub>b</sub> de Brasil, UK y Corea del Sur (Borsuk et al., 2009; Cho et al., 2015), aunque la descripción del proteoma solo aporta información teórica sobre la inmunogenicidad de sus componentes.

Existen estudios que describen el inmunoproteoma de *M. tuberculosis* (Kunnath-Velayudhan et al., 2010) pero se dispone de muy poca información sobre las proteínas inmunogénicas de *M. bovis*. No obstante, en los últimos años se han descrito alguna de las proteínas de *M. bovis* que interaccionan con el sistema inmunitario del hospedador y que bien pudieran incorporarse como nuevos antígenos para el diagnóstico de la tuberculosis (Lyashchenko et al., 2017; Meng et al., 2015; Souza et al., 2012)

El análisis del proteoma serológico o SERPA (*Serologic Proteome Analysis*) para la descripción e identificación del inmunoproteoma está ampliamente referenciado. Dicho análisis combina la separación de proteínas en geles 2D-PAGE con la posterior identificación de las mismas por Western-Blot utilizando para el desarrollo del ensayo los sueros de animales infectados. Las proteínas detectadas por los anticuerpos se identifican por espectrometría de masas, normalmente MALDI-TOF MS. Este método, a pesar de aplicarse con mucha frecuencia, tiene la desventaja de que no permite identificar proteínas que se encuentren en baja concentración. Además, una vez identificadas las proteínas, con un suero policlonal, no es posible purificar individualmente cada una de ellas. Este hecho puede solventarse utilizando anticuerpos monoclonales (AcM) con los que en primer lugar se identifica la proteína inmunogénica frente a las que se ha generado y posteriormente se utilizan como inmunoabsorbentes para su purificación.

El objetivo de este estudio fue caracterizar la respuesta inmunológica humoral frente a la PPD<sub>b</sub> en el modelo de ratón e identificar las proteínas inmunogénicas con los AcM generados a partir de los animales inmunizados. Utilizando uno de estos anticuerpos hemos aislado un complejo multiproteico al que hemos denominado P22, el cual ha sido empleado como antígeno para el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos para la tuberculosis animal.

## 1. Materiales y métodos

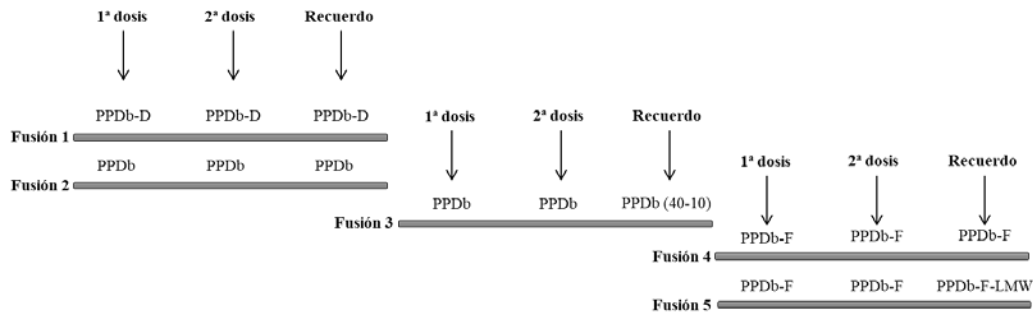
### 1.1. Antígenos

- **PPD<sub>b</sub>**: derivado proteico purificado procedente de un cultivo de *M. bovis* cepa AN5 y posterior inactivación por calor, filtración y precipitación por ácido Tricloroacético (TCA). El preparado empleado en este estudio es el comercializado por la empresa CZ Veterinaria (Porriño, España) y en su formulación contiene un 0,5% de fenol. Los productos que citamos a continuación son productos derivados de este.

- **PPDb-D:** se obtiene tras dializar frente a PBS, empleando una membrana de diálisis con un corte de 10 kDa, el preparado comercializado por CZ Veterinaria, con el fin de eliminar fundamentalmente el fenol.
- **PPDb (40-10):** antígeno que contiene las fracciones con un peso molecular comprendido entre 40 y 10 kDa obtenido tras separar los componentes de la PPDb mediante cromatografía de exclusión molecular en columna
- **PPDb-F:** filtrado que obtenemos tras someter a la PPDb a una cromatografía de afinidad utilizando como adsorbente uno de los AcM desarrollado en este trabajo, el SIM 377-18
- **PPDb-F-LMW:** tras someter la PPDb-F a SDS-PAGE, se eluyen del gel las proteínas de bajo peso molecular, menos de 15 kD, antígeno al que denominamos PPDb-F-LMW.

## 1.2. Pauta de inmunizaciones empleadas y obtención de hibridomas productores de AcM

Se inmunizaron por vía intraperitoneal, ratones BALB/c de entre 8 y 12 semanas de edad con 50 µg de antígeno en la primera dosis y de 25 µg en las dos siguientes, emulsionadas en adyuvante incompleto de Freund y separadas entre ellas al menos 15 días. A la semana de la segunda inoculación, se sangraron los animales y se determinó, mediante ELISA indirecto, el título de anticuerpos frente al antígeno de inmunización. El ratón con mayor título de anticuerpos específicos fue seleccionado como donante de esplenocitos y recibió una última dosis de recuerdo cuatro días antes del sacrificio del animal para llevar a cabo la hibridación. En total se realizaron 5 fusiones, los inmunógenos utilizados y las pautas de inmunización se resumen en la Figura 1.1.



**Figura 1.1.** Esquema de las fusiones realizadas, pautas de inmunización y antígenos administrados.

Para la hibridación se emplearon células del mieloma de ratón Sp2/0 Ag-14 mantenidas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF), penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100µg/ml) y glutamina (2mM). Los esplenocitos se fusionaron con las células de mieloma utilizando una solución al 50% de Polietilenglicol empleando protocolos estándares descrito por Goding (Goding, 1980). Para el crecimiento de los hibridomas se empleó el medio selectivo Clonacell-HY suplementado con aminopterina ( $4 \times 10^{-7} \text{M}$ ). Los sobrenadantes de los cultivos celulares se analizaron mediante ELISA de captura (Ec). Aquellos hibridomas cuyos sobrenadantes presentaban reactividades con densidades ópticas por ELISA por encima de 1 D.O, en las fusiones 1, 2 y 3, o 0,5 D.O- en las fusiones 4 y 5, se seleccionaron y expandieron para un posterior análisis mediante ELISA indirecto (Ei) y Western Blot (WB). Los hibridomas seleccionados tras estos análisis se clonaron dos veces mediante dilución límite en medio Clonacell-HY.

### 1.3. Inmunoensayos

#### ELISA indirecto:

Las placas se tapizaron con 50 µl del antígeno a una concentración de 10 µg/ml en PBS durante toda la noche a 4°C. A continuación, se bloquearon

con 75 µl de BSA al 2% en PBS durante 30 minutos a 37°C y se lavaron tres veces con PBST. En el caso de ser utilizado para la selección del ratón donantes de esplenocitos, se añadieron 50 µl por pocillo del suero (en diluciones seriadas de 1/2 en PBS empezando en una dilución de 1/10). Cuando el ELISA se empleó para analizar la reactividad de los hibridomas productores de anticuerpos, se añadieron 50 µl del sobrenadante de cultivo celular. Después de incubar 1 hora a 37°C, las placas se lavaron 3 veces con PBST y se añadieron 50 µl de suero policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugada con peroxidasa. Las placas se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 5 veces con PBST y se añadió 100 µl por pocillo de OPD a 1 mg/ml en tampón 0,2 M fosfato disódico-0,1 M ácido cítrico, pH 4.9, suplementado con peróxido de hidrógeno a una dilución 1/1.000. La reacción colorimétrica se detuvo mediante la adición de 50 µl por pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 492 nm.

**ELISA de captura:**

Los antígenos utilizados en este ensayo (PPDb y PPDb-F) se marcaron con biotina a una concentración de 1 mg/ml en una relación molar 1:20 Ag:biotina. Para la PPDb, al ser una mezcla compleja formada por proteínas de amplio rango de pesos moleculares, se estimó un peso molecular medio de 50 kD. Posteriormente, cada lote de antígeno marcado se tituló en un ELISA de captura utilizando el suero policlonal de la fusión correspondiente a una dilución 1:500 (v/v). El antígeno marcado se tituló en diluciones seriadas de 1/2 comenzando en una dilución 1/20. Para la PPDb se seleccionó la dilución 1/500 y para la PPDb-filtrado 1/200, que corresponde a concentraciones de 2 y 5 µg/ml de proteínas totales respectivamente.

Las placas se tapizaron con 50 µl (3 µg/ml en PBS) de suero policlonal de cabra anti IgG de ratón durante toda la noche a 4°C. A continuación, se bloquearon durante 30 minutos a 37°C con 75 µl de BSA al 2% en PBS, se lavaron con PBS-T 3 veces y se añadió 50 µl de sobrenadante de los pocillos incubándose durante 2 horas a 37°C. Finalizada la incubación, las placas se lavaron con PBST y se agregaron 50 µl de PPDb marcado con biotina a una dilución de 1/500 (F1, F2 y F3) o PPDb-F a una dilución 1/200 (F4 y F5) diluido



## *Estudios experimentales*

en PBST suplementado con 2% de BSA. Las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y tras 3 lavados PBS-T se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa en una dilución 1/2.000 durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción colorimétrica se desarrolló como se ha descrito en el apartado anterior.

### **Western blot:**

Todos los antígenos se sometieron a electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras en gel de acrilamida-bisacrilamida (12,5%). Una vez separadas las proteínas, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. Para desarrollar el WB las membranas, cortadas en tiras, se bloquearon con leche desnatada al 5% diluida en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente y se incubó cada tira con el sobrenadante de cada hibridomas y como control positivo con el suero policlonal (dilución 1/100) durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación, se lavaron con PBST tres veces y se incubaron con suero de cabra anti IgG de ratón conjugada con peroxidasa durante una hora a temperatura ambiente. Los antígenos reconocidos por los AcMs se visualizaron incubando las membranas con DAB suplementado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una dilución 1/1.000.

### **ELISA de determinación de isotipo:**

Básicamente es un ELISA de captura en el que se utilizan 6 réplicas de cada sobrenadante y en lugar de antígeno marcado con biotina se utilizan los correspondientes anti isotipos (anti-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, kappa y lambda) marcados con peroxidasa durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción colorimétrica se desarrolló como se indicó en los apartados anteriores.

## **1.4. Purificación de los antígenos**

Para identificar las proteínas reconocidas por los AcMs procedimos a su purificación mediante cromatografía de afinidad. Para ello cada AcMs, purificado mediante columnas de proteína G, se acopló a una matriz HiTrap NHS-activated HP, siguiendo el protocolo suministrado por Amershan Pharmacia Biotech.

La muestra purificada se analizó mediante SDS-PAGE por duplicado: una de las calles se tiñó con el colorante azul de Coomassie para visualizar las bandas teñidas y la otra se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para confirmar que la proteína purificada era aquella reconocida por el AcM específico mediante WB. La banda teñida se cortó y se procedió al análisis mediante MALDI-TOF MS para su identificación.

### 1.5. Identificación de los antígenos mediante MALDI-TOF MS/MS

La identificación de las proteínas se realizó en el servicio de proteómica del Centro de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid. Según metodología suministrada por este servicio, las bandas que contenían las proteínas teñidas con Azul Coomassie se cortaron manualmente y se depositaron en placas de 96 pocillos para procesarlas automáticamente en un Proteineer DP. El protocolo de digestión utilizado, fue el descrito por Shevchenko (Shevchenko et al., 2006), empleando como enzima proteolítica tripsina de grado proteómico.

Para el análisis por MALDI-TOF/TOF, las muestras se adquirieron automáticamente en un espectrómetro de masas ABi 4800 MALDI TOF / TOF en modo reflector de iones positivos y los espectros obtenidos se almacenaron en el ABi 4000 Series Explorer Spot Set Manager. Para enviar los datos combinados de PMF y MS/MS al software MASCOT v.2.5.0 (Matrix Science, Londres, RU), se utilizó GPS Explorer v4.9, buscando en la base de datos de proteínas de Uniprot/SwissProt (23701 secuencias) de Actinobacteria. Se usaron los siguientes parámetros de búsqueda: i) enzima: tripsina; ii) puntos de corte omitidos permitidos: 1; iii) modificación fija: carbamidometilcisteína por el tratamiento con yodoacetamida; iv) modificaciones variables: oxidación de metionina; v) la tolerancia de masa para los precursores se estableció en  $\pm 50$  ppm y para los fragmentos de MS/MS en  $\pm 0,3$  Da. El intervalo de confianza para la identificación de proteínas se estableció en  $\geq 95\%$  ( $p < 0,05$ ) y solo los péptidos con una puntuación individual por encima del umbral de identificación se consideraron identificados correctamente.

### 1.6. Cromatografía líquida de exclusión molecular y análisis mediante dot-blot

La PPD<sub>b</sub> fue analizada por cromatografía líquida empleando una columna de exclusión molecular. Como fase líquida se empleó PBS. En el bucle de carga se inyectaron 280 µl de PPD<sub>b</sub> (1 mg/ml) y se separaron en 54 fracciones de 0,5 ml empleando un flujo isocrático de 0,5 ml/minuto.

Para llevar a cabo el dot-blot, se depositaron 5 µl de las fracciones 13-36 en papel de nitrocelulosa previamente humidificado y se dejó secar al aire. Una vez seco se bloqueó con leche desnatada al 5% en PBS durante 15 minutos y a continuación se incubó con el AcM correspondiente durante 20 minutos a 37°C. Tras los tres lavados con PBST se incubó con el anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado con HRP) durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Después de dos lavados con PBS-T y uno adicional con PBS, se añadió DAB para detectar aquellas fracciones que presentaban reactividad con los AcMs.

Puntualmente, el preparado comercial de PPD<sub>b</sub> se sometió a diversos tratamientos previos a su análisis por exclusión molecular:

**1) Tratamiento con RNasa:** siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial, a una muestra de 500 µl (1 mg/ml) de PPD<sub>b</sub> se añadieron 2 µl (0,5 µg/ul) de RNasa y se incubó durante 30 minutos a 37°C.

**2) Tratamiento con DNasa:** siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial, a 450 µl (1 mg/ml) de PPD<sub>b</sub> se les añadieron 50 µl del buffer de incubación (10X), 15 unidades de la enzima (1,5 µl) y se incubó a 37°C durante 10 minutos.

**3) Tratamientos con alta fuerza iónica:**

3.1) 0,5 M NaCl: 500 µg de PPD<sub>b</sub> se dializaron frente a 0,5 M NaCl durante toda la noche. En este caso se empleó como fase móvil en la cromatografía de exclusión molecular 0,5 M NaCl con el que previamente se equilibró la columna

3.2) PBS suplementado con 2% de butanol, que equivale a una fuerza iónica similar a 3 M urea. Para ello se añadió butanol hasta una concentración del 2% en 500  $\mu$ l (1mg/ml) de PPDb y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Como fase líquida se utilizó PBS suplementado con butanol al 2% con el que previamente se equilibró la columna de cromatografía.

### 1.7 Resonancia de plasmones superficiales

La determinación de la constante de disociación ( $K_D$ ) se llevó a cabo mediante Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR, Surface Plasmon Resonance) en un equipo Biacore X100. Se calculó la  $K_D$  del AcM SIM 377-18 frente a las proteínas recombinantes MPB70 y MPB83. Para ello se utilizó un chip CM5 en el que previamente se habían inmovilizado mediante un enlace amida 10000-12000 unidades de resonancia (RU, Resonance Units) de anticuerpos de cabra anti-ratón siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. El protocolo utilizado para el cálculo de la  $K_D$  fue un ciclo simple utilizando como tampón PBS-T:

- Equilibrado del chip con PBST
- Captura del ligando hasta alcanzar 800-1000 RUs. Para ello, el AcM inyectó durante 300 segundos a 10 ng/ $\mu$ l.
- Asociación (ligando-analito): en el ciclo simple el analito se pasa a concentraciones crecientes (desde 100 nM hasta 1600 nM) durante 100 segundos cada concentración.
- Disociación durante 300 segundos con PBST.
- Regeneración: con 10 mM HCl durante 200 segundos.

Los datos obtenidos se analizaron en el software del equipo para calcular las  $K_D$ . Estos datos se ajustaron a un modelo de unión antígeno-anticuerpo 1:1 para calcular las constantes de asociación y disociación ( $k_a$  y  $k_d$  respectivamente). La  $K_D$  se calcula como la ratio de  $k_a$  y  $k_d$ .

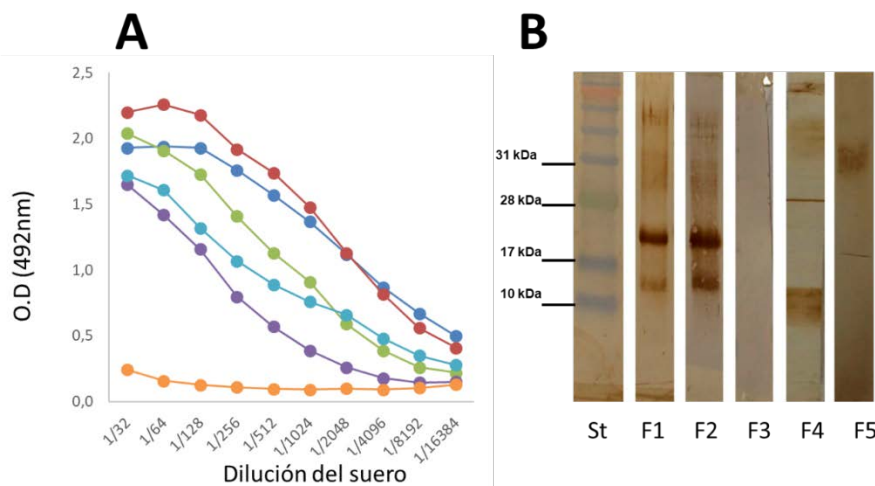
## 2. Resultados y discusión

### 2.1. Análisis de la respuesta inmune humoral de ratones frente a la PPDb.

#### Obtención y caracterización de AcMs e identificación de antígenos

Una vez inmunizados los ratones con PPDb o productos derivados de la misma y analizada su respuesta (Figura 1.2), procedimos, utilizando el bazo de estos animales, a la obtención de AcM. Se llevaron a cabo 5 hibridaciones (fusiones) generando un total de 90 AcMs que fueron seleccionados, inicialmente, mediante ELISA de captura, por ser el ensayo más adecuado si, como en nuestro caso, quieren utilizarse para inmunopurificar la proteína que reconocen. Posteriormente, basándonos en la caracterización mediante otros inmunoensayos (WB, Ec y Ei) y realizar dos clonajes a dilución límite (1 célula/pocillo) se quedaron reducidos a 14 AcM (Tabla 1.1).

En la figura 1.2 aparece representada la reactividad del suero del ratón seleccionado como donante de esplenocitos para cada una de las hibridaciones, por Ei frente a PPDb (A) y por WB frente el antígeno con el que se administró la dosis de recuerdo (B). Las diferencias observadas inicialmente en la reactividad del suero, pudimos posteriormente constatar que estaba relacionada con el número de hibridomas positivos obtenidos tras la fusión y con la intensidad de la reactividad.



**Figura 1.2. Reactividad de los sueros de los animales seleccionados como donantes de esplenocitos. A:** Reactividad obtenida mediante un Ei frente a PPD<sub>b</sub> utilizada como antígeno de tapizado. **B:** Reactividad analizada por WB frente al antígeno empleado en la dosis de recuerdo. Fusión 1 (F1 ●), Fusión 2 (F2 ●), fusión 3 (F3 ●), Fusión 4 (F4 ●), Fusión 5 (F5 ●) y suero preinmune de ratón (●)

**Tabla 1.1:** Resumen de las características de las fusiones realizadas, así como de los AcMo finalmente desarrollados.

Fusión	Clones positivos (%) <sup>a</sup>	Clones seleccionados (%) <sup>b</sup>	Nº de AcMo seleccionados	Reactividad		
				Ec	Ei	WB(kDa)
F1	13	10 D.O ≥ 1	2	+++	+++	20/15
F2	99	34 D.O ≥ 1	2	+++	+++	20/15
F3	60	16 D.O ≥ 1	2	+++	+++	20/15
F4	1,25	11 D.O ≥ 0,5	4	+	+	8-15
F5	7,6	19 D.O ≥ 0,5	4	+	+	8-15/30-50

<sup>a</sup> Pocillos con D.O por Ec 2 veces el control negativo.

<sup>b</sup> Pocillos con D.O > 1 seleccionados para su análisis posterior por otros inmunoensayos

Teniendo en cuenta el inóculo y las proteínas reconocidas por los AcMs, dividimos el análisis en dos grupos. En el primero están incluidos los AcMs correspondientes a las fusiones 1, 2 y 3, y en el segundo las fusiones 4 y 5. La 1 y 2 se desarrollaron paralelamente, la diferencia entre ambas fue que en la primera los ratones fueron inoculados con el producto PPD<sub>b</sub>-D y en la segunda con la PPD<sub>b</sub> comercial. El objetivo de la diálisis era eliminar posibles compuestos tóxicos de bajo peso molecular, como el fenol, que pudieran interferir en la caracterización de la respuesta inmune humoral de los ratones o modificarla y por tanto también alterar la obtención de los AcM.

Como puede verse en la Figura 1.2 el título por ELISA y el perfil de reconocimiento por WB fue similar para el suero de los ratones donantes de la F1 y la F2. Sin embargo, en la primera selección, tras la fusión y considerando como positivos aquellos que tenían una densidad óptica por EC dos veces

superior a la del control negativo, el número de pocillos determinados como positivos fue del 13% en la primera hibridación frente al 99,9% de la segunda que finalmente quedaron reducidos al 2,5% (10 clones) y 8,5% (34), respectivamente, por ser los que tenían  $DO > 1$  (Tabla 1.1), punto de corte por nosotros establecido. A pesar de estas diferencias iniciales, parece que utilizar uno u otro inmunógeno afectaba al número de hibridomas obtenidos, pero no a las características de los mismos ya que independientemente de la fusión todos los AcM finalmente presentaban las mismas propiedades: Ec frente a PPD<sub>b</sub> con una  $DO > 3$ ; por WB en condiciones reductora se observaban dos bandas de 20 y 15 kDa; todos tienen isotipo IgG1 y no mostraron reactividad frente a la PPD<sub>a</sub>. Estos datos apuntaban, como habíamos supuesto, que la respuesta inmune humoral, al menos en intensidad, está modificada por la presencia en el inmunógeno de ciertos productos dializables de bajo peso molecular, como ha observado también el test de detección de IFN- $\gamma$  (Bezoz et al., 2011).

Analizamos la reactividad de los AcMs frente a distintas fracciones procedentes de la filtración por exclusión molecular de la PPD<sub>b</sub>. Solo se observó reactividad en las fracciones que contenían moléculas de alto peso molecular, 600-100 kDa, contrario al resultado esperado, entre 40-10 kDa, ya que los resultados previos por WB así lo apuntaban (Figura 1.3). Las fracciones de bajo peso molecular, además, eran las que contenían mayor cantidad de proteínas, ya que como puede verse en el cromatograma (Figura 1.4), el área comprendida entre las fracciones de 40 a 10 kDa era mayor considerablemente mayor que en las fracciones de alto peso molecular.

Aún sin identificar la proteína que reconocían cada uno de los AcM, los resultados inducían a pensar que habíamos obtenido anticuerpos monoclonales con características bioquímicas similares frente a una única proteína, presente como un monómero de 15-20 kDa en condiciones reductoras (Figura 1.3) o como un polímero en condiciones nativas en la PPD<sub>b</sub> (Figura 1.4).

Así, si nuestro objetivo era analizar más exhaustivamente la respuesta inmune humoral frente a la PPD<sub>b</sub>, debíamos poner en marcha estrategias que permitieran analizar otras posibles respuestas más débiles y enmascaradas

por otra más potente como la hasta ahora observada. A un grupo de ratones ya inmunizados con PPD<sub>b</sub> se les administró una dosis de recuerdo con el antígeno incluido en las fracciones de peso molecular entre 40 y 10 kDa y donde no se había observado reactividad con los AcM obtenidos a pesar de tratarse, como acabamos de indicar, desde un punto de vista cuantitativo la fracción proteica más relevante (Figura 1.4). Desarrollamos así la fusión F3. En este caso el 60% de los pocillos fueron positivos y se seleccionaron un 4% de total (16) con D.O >1 (Tabla 1.1). Sorprendentemente, todos volvieron a presentar las mismas características bioquímicas que los de las hibridaciones 1 y 2. Este hecho nos hacía concluir que la proteína reconocida por los AcMs debía ser altamente inmunogénica ya que a pesar de encontrarse mínimamente representada en las fracciones de bajo peso molecular, Figura 1.4, se inducía una expansión clonal de linfocitos secretores de anticuerpos frente a ella y solo detectable frente a ella.

Quedaba claro pues, que si queríamos obtener AcM frente a otros componentes debíamos cambiar de estrategia de inmunización y de selección. Utilizamos una columna de afinidad conjugada con el AcM SIM 377-18, elegido entre los AcM de las tres hibridaciones por adaptarse mejor a condiciones de cultivo, a través de la cual filtramos el preparado comercial de PPD<sub>b</sub>. La parte no retenida en la columna, el filtrado, lo denominamos PPD<sub>b</sub>-F y corresponde a un antígeno en el cual debe haber una reducción considerable de la proteína de 20/15kDa reconocida por este AcM. Al eluido, parte retenida en la columna por unirse específicamente al AcM SIM 377-18 utilizado como inmunoabsorbente, y posteriormente liberado como hemos descrito en materiales y métodos, lo denominaremos desde ahora como P22.

El antígeno PPD<sub>b</sub>-F se administró en paralelo a dos grupos de ratones; el primer grupo dio lugar a la hibridación nº 4, en el que tanto el antígeno de las inmunizaciones como la dosis de recuerdo fue PPD<sub>b</sub>-F (Figura 1.1). En el segundo grupo de animales que dio lugar a la hibridación número 5 (F5), la dosis de recuerdo solo contenía las proteínas de bajo peso molecular del PPD<sub>b</sub>-F- LMW (Figura 1.1). Como queda reflejado en la reactividad del suero de los ratones (Figura 1.2), el filtrado fue un producto menos inmunogénico y que tras la fusión se tradujo en un número de clones positivos iniciales más

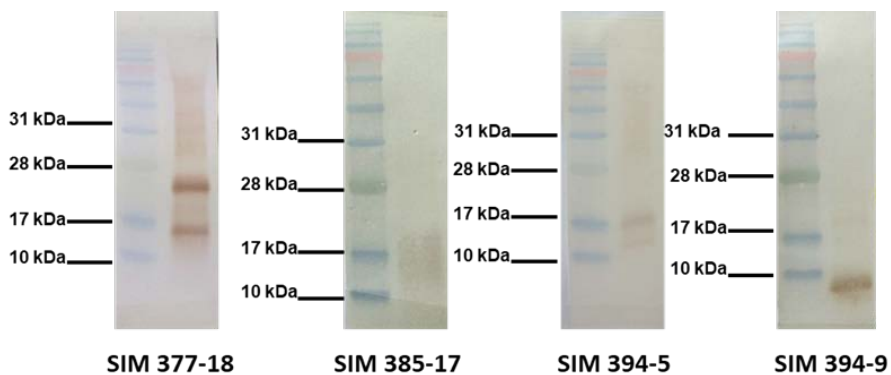


bajo, el 1,25% en la F4 y 7,6 % para la F5. Además, la intensidad de la respuesta observada en el Ei fue claramente inferior, por ello, establecimos el punto de corte de selección por Ec en 0,5 D.O. vs 1 D.O. de la F1, F2 y F3 para finalmente seleccionar 11 hibridomas de la F4 y 19 de la F5. Resaltar que a pesar de la baja reactividad inicial de estas dos fusiones se seleccionaron tres de los cuatro AcMs tipos presentados en este trabajo, cuyas características aparecen en la Tabla 1.2. Los AcMs tipo fueron cuatro atendiendo al patrón de reconocimiento: SIM 377-18, SIM 385-17, SIM 394-5 y SIM 394-9, que reconocían 5 proteínas, 4 de ellas exclusivas de PPDb y la quinta compartida también con PPDA (Tabla 1.2).

Para la identificación de las proteínas, tras inmunopurificarlas a partir de la PPDb con cada uno de estos AcMs, la muestra se sometió a SDS-PAGE (Figura 1.3) y la banda teñida con azul Coomassie se procesó e identificó mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF MS/MS). Con el AcM SIM 377-18 se purificaron dos proteínas que colocalizaban tanto en la banda de 20 como en la de 15 kDa y que se identificaron como MPB70 y MPB83. El hecho de que ambas proteínas aparezcan en bandas de distinto peso molecular es compatible con diferentes procesamiento de estas proteínas (Wiker, 2009). Se trata de dos proteínas homólogas con un 76% de identidad y 100% de cobertura (secuencias obtenidas de [www.uniprot.es](http://www.uniprot.es) y comparadas usando blast protein), por lo que no es de extrañar que el AcM reconociera una región común para ambas proteínas. En este caso los epítomos pudieran no ser exactamente los mismos o estar modificado el reconocimiento por las regiones adyacentes, ya que cuando determinamos las  $K_D$  del anticuerpo con la MPB70 es de 100 nM y con la MPB83 es de 20 nM. Con el AcM SIM 385-17 se identificó la *Meromycolate acyl carrier protein*, con SIM 394-5 la *Heat Shock Protein X (HspX)* y con SIM 394-9 la *6 kDa Early Secreted Antigenic Target (ESAT-6)* (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2.** Identificación y características de las proteínas reconocidas por los AcMs tipo.

AcM	Proteína	PM (kDa)	P <sub>i</sub>	Localización	Score
SIM 377-18	MPB70	19	4,75	Extracelular	283
SIM 377-18	MPB83	22	4,86	Membrana	211
SIM 385-17	<i>Meromycolate acyl carrier protein</i>	13	4	Citoplasma	660
SIM 394-5	HspX	16	5	Citoplasma	336
SIM 394-9	ESAT-6	9.8	4,48	Extracelular	160

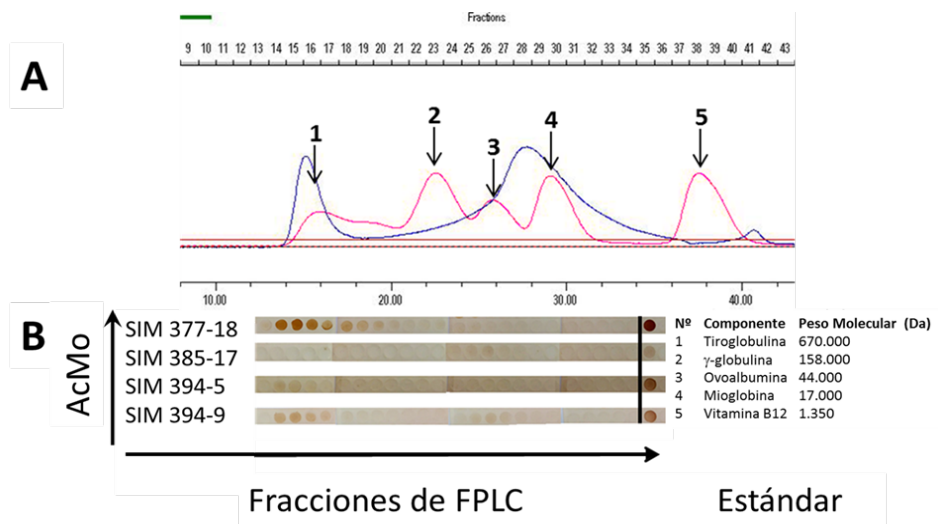


**Figura 1.3:** Reactividad por WB de los AcMs seleccionados. El antígeno electrotransferido en cada uno de los casos es el mismo que se administró en la última dosis de recuerdo administrada al animal donante de esplenocitos.

## 2.2. Análisis de la PPDb y derivados mediante cromatografía de exclusión molecular

Analizamos mediante dot-blot con los cuatro AcMo tipo las fracciones de la 13 a la 36, resultantes del fraccionamiento por cromatografía de exclusión

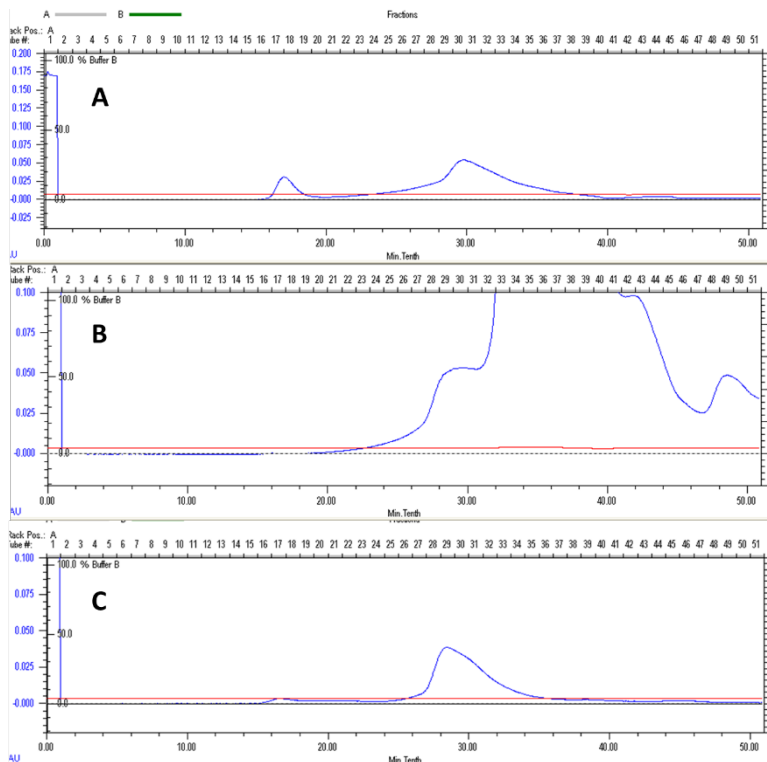
molecular de la PPDb, por ser en este rango donde detectábamos proteínas. La reactividad frente a las proteínas MPB70/83 solo aparece en las fracciones 14-20 ( $\approx 600\text{-}200\text{ KD}$ ); frente a la *meromycolate acil carrier* aparece muy débilmente en las fracciones 25-27 ( $\approx 17\text{ KD}$ ); HspX en las fracciones 14-16 ( $>200\text{ kDa}$ ); y la ESAT-6 fue en la única que observamos que se encontraba formando parte tanto del polímero (en las fracciones 14-17 que corresponde a  $600\text{-}200\text{ kDa}$ ) como en forma de monómero en las fracciones 26-29 ( $< 17\text{ KD}$ ) (Figura 1.4).



**Figura 1.4:** Reconocimiento mediante dot-blot de las fracciones resultantes tras la filtración por exclusión molecular de la PPDb. Cromatograma de filtración por exclusión molecular de la PPDb (—) preparación estándar de proteínas con pesos moleculares conocidos (—) (A). Reactividad por dot-blot con los 4 AcM tipo frente a cada una de las fracciones. El último punto de cada serie corresponde a la reactividad de cada anticuerpo frente a PPDb sin fraccionar (B).

Concluimos pues que en la PPDb se encontraba un polímero y que como mínimo contenía las 4 proteínas reconocida por los AcM y que habíamos identificado previamente. Para saber si estos polimeros eran consecuencia del proceso de fabricación de la PPDb o se encontraba naturalmente en el medio de cultivo de *M. bovis*, sometimos a cromatografía

de exclusión molecular un sobrenadante del cultivo de *M. bovis* inactivado térmicamente y analizamos la presencia de proteínas con los 4 AcMo tipo. La reactividad no aparecía en las fracciones de alto peso molecular, sino que se observaban en torno a los pesos moleculares predicho de 20 y 14 kD. Cuando sometimos a este sobrenadante a una precipitación con sulfato amónico, emulando el proceso de fabricación, el patrón obtenido era similar al de la PPDb industrial (Figura 1.5). Con el objetivo de conocer la naturaleza de este polímero, sometimos a la PPDb a tratamientos con DNAsa, RNAsas o alta fuerza iónica y tras el tratamiento el polímero no se disgregaba siendo sólo posible cuando se trataba con agentes desnaturizantes como el SDS. (Figura 1.6.), lo que parecía indicar que el polímero era de naturaleza lipoproteica, hecho que por dificultades técnicas no pudimos constatar.



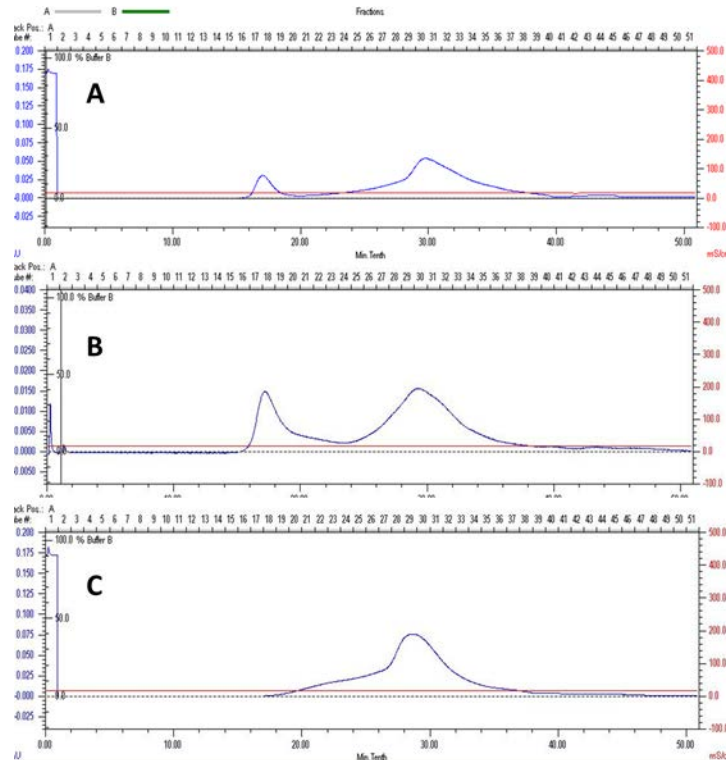
**Figura 1.5:** Cromatograma de la PPDb (A), sobrenadante inactivado de un cultivo de *M. bovis* (B) y precipitación con sulfato de amonio de este sobrenadante (C). Se observa la presencia de agregados de alto peso molecular en la PPDb que no están

presentes en el sobrenadante de *M. bovis*. Al precipitar las proteínas estos agregados comienzan a aparecer.



**Figura 1.6.** Reactividad por dot-blot con el AcM SIM 377-18 frente a cada una de las fracciones de exclusión molecular de la PPDb tratada con RNasa **(A)**, DNasa **(B)** y alta fuerza iónica **(C)**. El último punto de cada serie corresponde a la reactividad de cada anticuerpo frente a PPDb sin fraccionar.

Por último, en el proceso de caracterización por cromatografía de exclusión molecular de la P22 (Figura 1.7) observamos un patrón de reactividad similar al de la PPDb. Si lo que sometíamos a cromatografía de exclusión molecular era el filtrado resultante de la inmunopurificación de la P22 (PPDb-F) y analizábamos la reactividad con los AcM el patrón era diferente. En este caso, observábamos como la presencia de proteínas y la reactividad frente a los agregados de alto peso molecular desaparecía, presentando solo reactividad el SIM 394-9 (anti ESAT-6) en fracciones correspondientes al peso molecular de la proteína monomérica. Esto quiere decir que los agregados presentes en la PPDb se pueden retirar de ésta mediante cromatografía de afinidad utilizando el AcM SIM 377-18. (Figura 1.7).



**Figura 1.7:** Cromatograma de la PPDb (A), P22 (B) y PPDb-F (C). Se observa la presencia de agregados de alto peso molecular en la PPDb y en la P22, que desaparecen en PPDb-F.

### 3. Resumen

El diagnóstico de la tuberculosis bovina se basa en la respuesta inmunológica de base celular inducida frente a PPDb de los animales infectados. Sin embargo, se tiene un escaso conocimiento de la respuesta humoral. A pesar de haberse descrito el proteoma de la PPDb, se sabe muy poco sobre la capacidad que tienen las proteínas que la constituyen para inducir una respuesta celular o ser reconocidas por los anticuerpos generados tras una infección por especies del MTBC. Por ello, nuestro objetivo en este estudio fue caracterizar la respuesta de anticuerpos frente a la PPDb e inmunopurificar e identificar las proteínas involucradas en dicha respuesta.

Obtuvimos un total de 4 AcMo tipo que nos han permitido identificar cinco proteínas inmunodominantes presentes en la PPD<sub>b</sub>: MPB70, MPB83, HspX y ESAT-6, exclusivas del MTBC, y la *meromycolate acyl carrier protein*, presente también en la PPD<sub>a</sub>. Las cuatro primeras forman parte de un complejo multiproteico, que se obtiene siempre tras la inmunopurificación de la PPD<sub>b</sub> con un AcM (SIM 377-18) que reconoce tanto a la MPB70 como a la MPB83 también presentes en el complejo.

Así, podemos concluir que cuando los ratones son inoculados con la PPD<sub>b</sub> se observa casi exclusivamente una respuesta serológica de alta intensidad frente a MPB70/83, no dependiente del antígeno de selección; solo cuando MPB70 y 83 son eliminadas de la PPD<sub>b</sub> podemos obtener AcM frente a otras proteínas que son también altamente inmunogénicas y relativamente abundantes. Por ello hipotetizamos que la respuesta, casi en exclusiva, frente a las proteínas MPB70 y MPB83 podría ser debido a que estas estaban formando parte de un complejo multiproteico (P22), altamente inmunogenico, a una concentración muy superior al resto de las proteínas englobadas en el mismo complejo (al menos 32%, ver en el capítulo siguiente) y posiblemente orientadas de tal forma, tipo micela, que viera así favorecido su procesamiento por el sistema inmunitario frente al resto de proteínas, generándose una respuesta única frente a ellas en un proceso similar al descrito en las inmunizaciones con liposomas (Schwendener, 2014).

## Estudio 2: análisis inmunoproteómico de *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *C. pseudotuberculosis*.

En el diagnóstico de tuberculosis, ya sea de base celular o mediante la detección de anticuerpos específicos, tienen lugar reactividades no específicas que dificultan el diagnóstico certero de los animales. La similitud antigénica observada entre las especies incluidas en el MTBC con el MAC, otras micobacterias del grupo MOTT y otros géneros filogenéticamente relacionados (por ejemplo *Corynebacterium*) se ha considerado como responsable de interferencias en el diagnóstico de la tuberculosis, que se traduce en una disminución de la sensibilidad y la especificidad de las pruebas diagnósticas, clasificando incorrectamente tanto animales sanos como infectados (Alvarez et al., 2014; Alvarez et al., 2009; Vordermeier et al., 2007).

*M. avium* subsp. *avium* (MAA), bacteria de la que procede la PPDa, es una bacteria ambiental que sensibiliza a los animales razón por la cual, en el diagnóstico se compara la reactividad de la PPDb con la reactividad de la PPDa y así aumentar la especificidad del mismo (Bezoz et al., 2014a). *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), agente causal de la paratuberculosis, también puede producir interferencias en el diagnóstico, ya sea por una infección por el agente etiológico o por la vacunación frente a la bacteria. Por ello, en el ganado vacuno sometido a campaña de erradicación está prohibida la vacunación, tanto de tuberculosis como paratuberculosis. Sin embargo, no es así en el ganado caprino, donde la tuberculosis no está sujeta a un programa de erradicación y por ello está permitido la vacunación frente a paratuberculosis. Por último, *C. pseudotuberculosis*, agente causal de la linfadenitis caseosa, está estrechamente relacionada con las micobacterias y se pensaba que también podía producir interferencias diagnósticas. Pero estudios recientes parecen indicar que no interfiere en las pruebas de diagnóstico oficiales de la tuberculosis en cabras (Bezoz et al., 2015).

En los estudios proteómicos en los que se describen la composición de la PPDb y la PPDa se identifican proteínas comunes presentes en ambos



productos atribuyéndose fundamentalmente la reactividad cruzada a unas pocas proteínas, entre las que las chaperonas son las principales candidatas (Borsuk et al., 2009; Cho et al., 2012). Identificar el máximo número de proteínas implicadas en la reactividad cruzada y diseñar métodos que permitan eliminarlas de los reactivos empleados en el diagnóstico de la tuberculosis para que incluyan únicamente proteínas del MTBC supondría un gran avance. Consideramos fundamental identificar el máximo número de proteínas compartidas entre la PPD<sub>b</sub>, la PPD<sub>a</sub>, MAP y *C. pseudotuberculosis*. Hipotetizamos que aquellas proteínas que interfirieran en el diagnóstico deberían ser inmunogénicas. Por ello, al igual que ya habíamos hecho con la PPD<sub>b</sub>, abordamos el análisis inmunoproteómico mediante el desarrollo y obtención de AcM para identificar proteínas comunes o exclusivas de la PPD<sub>b</sub>, PPD<sub>a</sub>, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *C. pseudotuberculosis*.

## 1. Materiales y métodos

### 1.1. Diseño experimental

Para llevar a cabo este estudio se inmunizaron 16 ratones hembras BALB/c de entre 8 y 12 semanas distribuidos en grupos de 4 animales cada uno. Las pautas de inmunizaciones se llevaron a cabo igual que en el estudio anterior: tres dosis de antígeno separadas al menos dos semanas entre ellas. Una semana después de la segunda inmunización, se analizó el título de anticuerpos en el suero de los ratones mediante Ei frente al antígeno de inoculación. Tras comprobar el título de anticuerpos específicos, procedimos a administrarles, 5 días antes de la fusión, una dosis de recuerdo con el antígeno de inoculación o variaciones del mismo dependiendo del grupo experimental.

### 1.2. Antígenos empleados en la obtención de los AcM

Los antígenos con los que se inmunizaron los animales fueron:

- **PPD<sub>a</sub>**: PPD procedente de un cultivo MAA (cepa D4 ER) comercializada por CZ Veterinaria.

- **Vacuna Gudair:** es la vacuna frente a paratuberculosis comercializada por la empresa CZ Veterinaria que se utiliza para la inmunización de cabras y ovejas.
- **Antígeno soluble de MAP:** para su elaboración se empleó un cultivo de MAP proporcionado por CZ Veterinaria. La fracción soluble celular se obtuvo a partir del sedimento bacteriano, previamente lavado con PBS. Este sedimento se resuspendió posteriormente en el mismo volumen de PBS y de bolas acero inoxidable de 0,2 mm y se sometieron a un ciclo de lisis (5 minutos a velocidad 8) en el homogenizador Bullet Blender. La mezcla se centrifugó (15000 x g 1 minutos) y el sobrenadante constituye el antígeno soluble en el que llevamos a cabo la valoración de proteínas.
- **Antígeno soluble de *C. pseudotuberculosis*:** se utilizó el mismo protocolo descrito para MAP utilizando en este caso un cultivo de *C. pseudotuberculosis* proporcionado por el Servicio de Bioseguridad del centro VISAVET.

En la selección de los AcM además de los antígenos que acabamos de indicar, se emplearon también la PPD<sub>b</sub> y la P22, productos ya descritos en el capítulo anterior.

### 1.3. Inmunoensayos y purificación e identificación de proteínas

La titulación de anticuerpos en suero y el cribado de hibridomas secretores se realizaron mediante Ei, Ec y WB empleando los mismos protocolos descritos en Estudio 1. En el Ec se emplearon la PPD<sub>a</sub> y los antígenos solubles de MAP y *C. pseudotuberculosis* marcados con biotina a una dilución 1/200. El marcaje con biotina se realizó a una relación molar (antígeno:biotina) 1:20 a una concentración de proteínas de 1mg/ml. La purificación de los AcM, la conjugación de los mismos a la matriz cromatográfica, la purificación de los antígenos que reconocen y la identificación MALDI-TOF MS se llevó a cabo siguiendo la misma metodología que en el estudio anterior de la PPD<sub>b</sub>.

### 1.4. Citometría de flujo

La citometría de flujo se realizó con células de *M. bovis* BCG, MAA (cepa D4 ER), MAP (cepa 316F) y *C. pseudotuberculosis*. Sobre el pellet correspondiente a  $10^8$  bacterias se añadió 100  $\mu$ l de cada uno de los AcM a ensayar. Tras incubar a temperatura ambiente durante 1 hora, se lavaron con PBS por centrifugación ( $15.000 \times g$  2 min) y se incubaron con 100  $\mu$ l del anticuerpo secundario (suero policlonal de cabra anti-IgG de ratón marcado con ALEXA 488) a una dilución 1/500. Las células se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, se lavaron con PBS por centrifugación ( $15.000 \times g$  1 min) y se analizaron en un citómetro de Flujo FACScalibur.

### 1.5. Inmunofluorescencia Indirecta

Para llevar a cabo la inmunofluorescencia indirecta (IFI) se prepararon portaobjetos de 24 pocillos con un diámetro de 4 mm en los que se fijaron *M. bovis* BCG, MAA, MAP o *C. pseudotuberculosis*. De una suspensión bacteriana en RPMI ( $10^8$  bacterias/ml) se depositaron 10  $\mu$ l por pocillo para posteriormente, una vez secos, fijarse con una mezcla de acetona/metanol (v/v) durante 10 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

El desarrollo de la IFI se llevó a cabo añadiendo sobre el pocillo 10  $\mu$ l de cada uno de los AcM analizados (25 AcM) y los portaobjetos se incubaron 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en ambiente húmedo. A continuación, se lavaron 3 veces en PBS durante 10 min y se añadió el anticuerpo secundario de cabra frente a inmunoglobulina de ratón marcado con Alexa 488 a una dilución 1/50 y suplementado con azul de Evans (40  $\mu\text{g/ml}$ ) y se incubó durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Finalizada la incubación se lavaron los portaobjetos 3 veces con PBS durante 10 minutos y un último lavado en agua destilada durante 10 segundos, y se montaron empleando como medio de montaje Fluoromont-G® para ser examinados en el microscopio óptico de luz U.V.

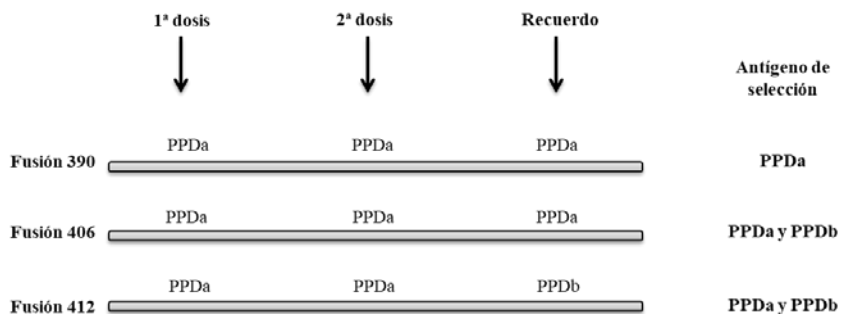
## 2. Resultados

Una vez inmunizados los ratones con los inmunógenos indicados (Figuras 2.1, 2.2 y 2.3), analizamos la respuesta y procedimos, al igual que en caso de la PPD<sub>b</sub> a la obtención de AcM. Pretendimos seleccionar los AcM que reconocieran las proteínas más inmunogénicas frente a PPD<sub>a</sub>, MAP y C. pseudotuberculosis. para posteriormente analizar si estas proteínas eran compartidas con la PPD<sub>b</sub>.

### 2.1. Obtención de AcM

#### AcM frente MAA

Para la obtención de AcM que reconocieran componentes de la PPD<sub>a</sub> realizamos tres fusiones. En todas ellas el cribado se llevó a cabo mediante Ec y aquellos pocillos con densidades ópticas más elevadas (por encima de 1 OD) se analizaron posteriormente mediante Ei y WB. La diferencia entre ellas estaba en que o bien el antígeno de selección de hibridomas o bien en el antígeno utilizado en la dosis de recuerdo eran diferentes (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Esquema de las fusiones realizadas, pautas de inmunización y antígenos administrados frente a la PPD<sub>a</sub>.

En la primera fusión (SIM 390) el antígeno utilizado tanto en la dosis de recuerdo como en la selección fue la PPD<sub>a</sub>. Se seleccionaron tres AcM tipo

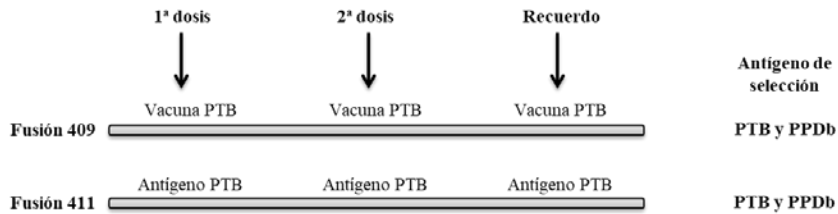
(Tabla 2.1) que reconocían dos proteínas. El SIM 390.3 y el SIM 390.19 reconocen, con distinto patrón por WB (datos no mostrados) PPE family proteína. La segunda proteína identificada, la ModD protein, tiene su homóloga en *M. bovis* (75% de identidad y 48 % de cobertura; secuencias obtenidas de [www.uniprot.es](http://www.uniprot.es) y comparadas mediante BLAST de proteínas) aunque el epítipo que reconoce el AcM no está presente en la proteína de esta última especie (Tabla 2.1).

En la segunda fusión (SIM 406) la pauta y antígeno de inmunización fue exactamente igual a la anterior, pero en la selección de los hibridomas se realizó un doble cribado con la PPDA y la PPDB, seleccionándose solo AcM que mostraban reactividad frente a ambas. Como era de esperar, los 3 AcM reconocen tres proteínas y epítipos presentes en *M. bovis* y *M. avium* (Tabla 2.1)

Por último, en la tercera fusión (SIM 412), la dosis de recuerdo fue con PPDB con el propósito de inducir una expansión clonal de aquellos linfocitos B que reconocen antígenos que están incluidos en la PPDB pero que comparten con la PPDA puesto que habían sido inducidos tras inmunizaciones con esta última. Se obtuvo un único AcM, SIM 412-6 seleccionado con ambas PPDs, que reconoce una proteína de 35 kDa denominada *diacylglycerol acyltransferase* que pertenece tanto a *M. bovis* como a *M. avium*, siendo la única proteína de las identificadas que se encuentra en el complejo proteico P22.

### AcM frente a MAP

Para obtener AcM frente MAP se emplearon dos abordajes (Figura 2.2). En el primero (SIM 409) los ratones fueron inmunizados con tres dosis de la vacuna comercial Gudair. Al ser la vacuna comercial una emulsión con aceites minerales, la selección se realizó con el antígeno soluble de la bacteria. Se obtuvieron 3 AcM tipo que presentan reactividad frente a MAP y a *C. pseudotuberculosis* con igual o incluso mayor intensidad. El SIM 409.14 y 409.39 también reconocían a las proteínas presentes en PPDB y PPDA (Tabla 2.1)



**Figura 2.2.** Esquema de las fusiones realizadas, pautas de inmunización y antígenos administrados frente a *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

En la segunda fusión (SIM 411) tanto las inmunizaciones como la selección de los hibridomas se llevó a cabo con antígeno soluble de MAP, y además se incluyó un segundo análisis con PPD<sub>b</sub>. Se obtuvieron un total de 6 AcM tipo de los cuales 2 presentan reactividad con la MAP y con PPD<sub>b</sub>. De nuevo como en la primera fusión la reactividad fue prácticamente igual a la observada en *C. pseudotuberculosis*, hecho que sorprende ya que MAP es una subespecie de *M. avium*, con lo que es de suponer que si son evolutivamente más cercanas deberían compartir más proteínas y por tanto reactividades más similares. Dos de los AcM también reconocen proteínas en la el P22, desgraciadamente por razones de procesamiento del antígeno no hemos podido identificar las proteínas reconocidas por los AcM, aunque esperamos resolverlo en breve.

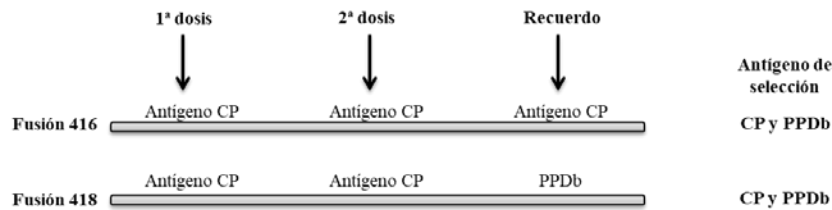
#### **AcM frente a *C. pseudotuberculosis*:**

Al igual que en el caso anterior intentamos inducir una respuesta que nos permitiera identificar proteínas compartidas entre PPD<sub>b</sub> y *C. pseudotuberculosis*. Se llevaron a cabo dos hibridaciones (Figura 2.3).

En la primera de ellas (SIM 416) con el fin de identificar las proteínas comunes, los animales recibieron dos dosis antígeno soluble de *C. pseudotuberculosis* y la última dosis de recuerdo con PPD<sub>b</sub> para inducir, como en el caso de MAP, una expansión clonal de linfocitos B que producen anticuerpos compartidos entre el antígeno de inmunización y el de recuerdo. Las proteínas identificadas GroEL y enolasa son las únicas que se encuentran en todos los antígenos analizados (Tabla 2.1). Este hecho no sorprende ya que

*Estudios experimentales*

se trata de proteínas muy inmunogénicas y muy conservadas evolutivamente (Bao et al., 2013), dos condiciones necesarias para observar dicho patrón de reactividad.



**Figura 2.3.** Esquema de las fusiones realizadas, pautas de inmunización y antígenos administrados frente a *C. pseudotuberculosis*.

Para la obtención de AcM específicos de *C. pseudotuberculosis* (SIM 418), la inmunización y la selección se llevó a cabo con antígeno soluble de *C. pseudotuberculosis*. Se realizaron dos selecciones simultaneas, una positiva con el antígeno soluble y una negativa con PPDb. Los 3 AcM obtenidos reconocen epitopos presentes exclusivamente en *C. pseudotuberculosis*, sino tenemos en cuenta la débil reacción que finalmente uno de ellos presentaba con la PPDb. Al igual que en el caso anterior las proteínas reconocidas no han sido identificadas, aunque estamos en proceso para hacerlo.

**Tabla 2.1.** Reactividad por ELISA indirecto de los AcM frente la PPD<sub>b</sub>, PPD<sub>a</sub>, M. avium subps. Paratuberculosis (MAP) y C. pseudotuberculosis (CP). Los valores de reactividad indicados son: (+++) 20 veces mayor que el control negativo; (++) 10 veces mayor que el control negativo; (+) 3 veces mayor que el control negativo y (-) por debajo de 3 veces el control negativo.

AcM	Inmunógeno	PPD <sub>b</sub>	PPD <sub>a</sub>	MAP	CP	P22	Proteína
<b>SIM 377-18</b>		+++	-	-	-	+++	MPB70/83
<b>SIM 385-17</b>	PPD <sub>b</sub> y derivados	+	+	++	-	-	Meromycolate acyl carrier protein
<b>SIM 394-5</b>		++	-	-	-	++	HspX
<b>SIM 394-9</b>		+++	-	-	-	+++	ESAT-6
<b>SIM 390-3</b>		-	+++	-	-	-	PPE family protein
<b>SIM 390-9</b>		-	++	+	-	-	ModD protein
<b>SIM 390-19</b>		-	+	-	-	-	PPE family protein
<b>SIM 406-11</b>	PPD <sub>a</sub>	+	++	-	-	-	Serine protease
<b>SIM 406-22</b>		+	+	+++	-	-	Meromycolate acyl carrier protein
<b>SIM 406-46</b>		+	++	+	+	-	ModD protein
<b>SIM 412-6</b>		+	++	+	-	+	Diacylglycerol acyltransferase
<b>SIM 409-14</b>		+	+	+	++	-	-
<b>SIM 409-18</b>		-	-	++	+	-	-
<b>SIM 409-39</b>	Vacuna PTB	++	+	++	+++	+	-
<b>SIM 411-4</b>		+	-	++	++	-	-
<b>SIM 411-8</b>		-	-	++	+	-	-
<b>SIM 411-13</b>		+	-	+++++	+	-	-



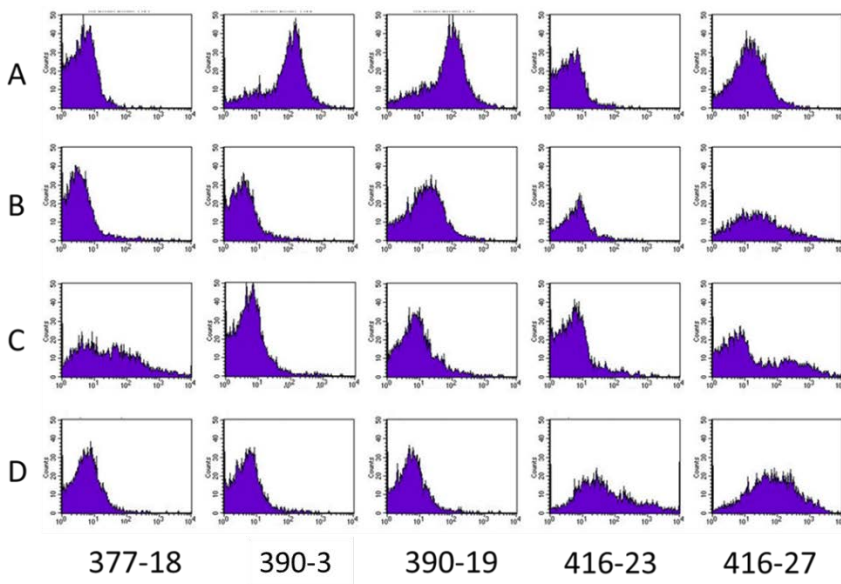
SIM 411-16	-	-	+++	-	-	-
SIM 411-19	+	+	+++	+	+	-
SIM 411-24	-	-	+++	+	-	-
SIM 416-23	++	+	+	+++	+	GroEL
SIM 416-27	+++	++	++	++	+++	Enolasa
SIM 418-12 Antígeno de CP	-	-	-	+	-	-
SIM 418-31	-	-	-	+	-	-
SIM 418-48	+	-	-	++	-	-

2.2. Citometría de flujo e Inmunofluorescencia

Inicialmente, siempre nuestro primer objetivo ha sido la identificación de antígenos y la producción de los mismos para ser utilizados en el desarrollo inmunoensayos que nos permitieran la detección de anticuerpos específicos en animales infectados. No obstante, nunca hemos perdido de vista la importancia de la detección de antígeno tanto con fines diagnóstico (inmunohistoquímica) o en investigación (citometría de flujo e IFI) de la tuberculosis bovina. Por ello, disponer de AcM específicos para ser empleados mediante inmunohistoquímica en el diagnóstico post-mortem pueden ser de gran ayuda a la hora de identificar el agente causal de la lesión y poder diferenciar entre tuberculosis, paratuberculosis y pseudotuberculosis.

Hemos analizado en primer lugar por citometría de flujo e IFI la reactividad de los AcM frente a bacterias de *M. bovis* BCG, MAA, MAP y *C. pseudotuberculosis*. Contamos con un AcM (SIM 377-18) específico para *M. bovis*, otro específico para MAA (SIM 390-3) y otro (SIM 419-23) específico para *C. pseudotuberculosis* por citometría de flujo. Además, contamos con un AcM que reconoce un epítipo común a las especies del complejo *M. avium* (SIM

390-19) y un AcM (SIM 416-27) que presenta reactividad con las cuatro especies bacterianas analizadas.



**Figura 2.4.** Análisis de la reactividad por citometría de flujo de los AcM frente a *M. avium* subsp. *avium* (A), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (B), *M. bovis* BCG (C) y *C. pseudotuberculosis* (D). Los AcM reconocen MPB70/MPB83 (SIM 377-18), PPE family protein (SIM 390-3 y SIM 390-19), GroEL (SIM 416-23) y Enolasa (SIM 416-27).

### 3. Resumen

Las interferencias en el diagnóstico de la tuberculosis se deben a proteínas comunes entre bacterias del MTBC y micobacterias no tuberculosas (*M. avium* subsp. *avium* y *M. avium* subsp. *paratuberculosis*) o bacterias relacionadas con las micobacterias como *Corynebacterium*. Hasta el momento, tras la identificación de proteínas de estas bacterias mediante técnicas de proteómicas, se atribuye a algunas chaperonas el fenómeno de reactividad cruzada. No obstante, la identificación de las proteínas compartidas en sí misma no aporta suficiente información sobre la inmunogenicidad de las mismas y por tanto de su implicación en fenómeno de reactividad cruzada. Para mejorar el diagnóstico y desarrollar reactivos

## Estudios experimentales

más específicos es necesario confirmar su capacidad de inducir una respuesta inmunológica, y en nuestro caso más concretamente de tipo humoral. Por ello, abordamos el estudio de la identificación de las proteínas compartidas entre *M. bovis*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *C. pseudotuberculosis*, mediante la obtención de anticuerpos monoclonales procedentes de animales inmunizados con las bacterias mencionadas o productos derivadas de ellas, como aparecen reflejados en los resultados que acabamos de describir. Es de esperar que un abordaje próximo, con las herramientas que ya disponemos, podamos eliminar las proteínas responsables de la reactividad cruzada en los compuestos empleados en el diagnóstico de la tuberculosis sin eliminar las que están induciendo una respuesta específica.

### 3.2. Capítulo II: caracterización proteómica de la PPD<sub>b</sub> y PPD<sub>a</sub> e identificación de antígenos específicos para el serodiagnóstico de la tuberculosis en los animales.

#### Estudio 3: caracterización proteómica de la PPD<sub>b</sub>, PPD<sub>a</sub> y P22

La PPD<sub>b</sub> es una preparación compleja compuesta por cientos de antígenos diferentes y componentes inmunoactivos (Yang et al., 2012). Muchos de estos componentes tienen homólogos en otras especies de micobacterias. Los miembros del género *Mycobacterium* presentan una alta similitud genética e inducen una respuesta inmune similar en los hospedadores infectados. La aparición de falsos positivos se atribuye, por tanto, a la sensibilización de los animales con antígenos homólogos presentes en micobacterias no tuberculosas. Por ello, en las pruebas de diagnóstico se compara la reactividad de la PPD<sub>b</sub> con la reactividad de la PPD<sub>a</sub>.

Los avances en el campo de la proteómica en los últimos años han permitido identificar muchos de los componentes de las PPDs que se emplean actualmente en el diagnóstico de la tuberculosis (Borsuk et al., 2009; Cho et al., 2015; Yang et al., 2012). En un estudio llevado a cabo por Borsuk et al. (2009), se identificaron mediante análisis proteómico en las PPDs bovina y aviar utilizadas en Reino Unido y Brasil un total de 116 proteínas en la PPD<sub>b</sub> y 87 en la PPD<sub>a</sub>, siendo 32 de ellas comunes a ambas PPDs. Un estudio similar de la PPD<sub>b</sub> utilizada en Corea del Sur permitió identificar 271 proteínas (Cho et al., 2015), de las cuales 33 ya se habían descrito en los estudios realizados en las preparaciones de Reino Unido y Brasil. De estas 33 proteínas, 15 de ellas son proteínas capaces de inducir teóricamente una fuerte respuesta inmunológica de base celular. Estos 15 antígenos de *M. bovis* presentan una alta homología con las proteínas de *M. avium* subsp *avium* y *M. avium* subsp *paratuberculosis*, a los que se les atribuye la aparición de falsos positivos observados en el diagnóstico de tuberculosis. En este sentido, nuestro laboratorio ha llevado a cabo un análisis proteómico de la PPD<sub>a</sub>, la PPD<sub>b</sub> y un subproducto de esta última (Infantes-Lorenzo et al., 2017), que pasamos a describir en los apartados siguientes de este capítulo.

### 1. Materiales y métodos

#### 1.1. Antígenos

- **PPDb**: antígeno comercial proporcionado por CZ Veterinaria (Porriño, España)
- **PPDa**: antígeno comercial proporcionado por CZ Veterinaria (Porriño, España)
- **P22**: antígeno P22 se purificó mediante cromatografía de afinidad a partir de la PPDb como se ha explicado en el estudio 1 del Capítulo 1. Este proceso ha sido protegido bajo la patente EP16382579, "Methods and compositions for tuberculosis diagnosis".

#### 1.2. Preparación de la muestra para el análisis proteómico

Las PPDs bovina y aviar se prepararon a partir de *M. bovis* AN5 y *M. avium* D4 ER respectivamente. P22 se obtuvo como se ha descrito en el Estudio 1 (punto 1.4. Purificación de antígenos, Materiales y métodos). Las muestras se analizaron por triplicado y todos los análisis proteómicos se llevaron a cabo en el Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología. Los protocolos que describimos a continuación fueron proporcionados por el Dr. Sergio Ciorda, persona responsable de dicho servicio.

Para llevar a cabo el análisis proteómico en primer lugar se procedió a la precipitación de las proteínas usando el método de ácido tricloroacético / acetona. A continuación, el pellet de proteínas se resuspendió y se desnaturalizó en urea 7M/tiourea 2M/TEAB 100 mM (pH 7,5), y se determina la concentración de proteínas mediante un kit comercial. Para la digestión se utilizó un volumen que contenía 20 µg de proteínas que se redujo con 2 µl de Tris (2-carboxietil) fosfina 50 mM (pH 8,0,) a 37 ° C durante 60 minutos. Finalmente, para bloquear las cisteínas, la muestra se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente con 2 µl de metanosulfonato de metilo 200 mM para y se diluye hasta un volumen final de 70 µl usando TEAB 25 mM para reducir la concentración de urea. La digestión triptica se llevó a cabo durante la noche a 37 °C con tripsina modificada de grado proteómico en una proporción de tripsina: proteína (p/p) de 1:20, deteniéndose la reacción

mediante la adición de ácido trifluoroacético al 1%. Las muestras desaladas se secan y almacenan hasta el momento del análisis proteómico.

### 1.3. Cromatografía líquida y espectrometría de masas

Se analizaron 1 µg de cada muestra mediante cromatografía líquida unidimensional en tándem con espectrometría de masas en un Eksigent nanoLC Ultra 1D plus acoplado a un espectrómetro de masas 5600 Triple TOF® equipado con una fuente Nanospray III. La columna analítica era una columna de sílice en fase reversa Waters Acquity UPLC M-Class Peptide BEH C18 (75 µm x 150 mm, partículas de 1,7 µm, 130 Å de poro). Como pre-columna se utilizó la columna Acclaim C18 PepMap™ 100 (100 µm x 2 cm, partículas de 5 µm, 100 Å de poro; ThermoFisher Scientific), que se conectó por delante de la columna analítica.

El caudal utilizado para el análisis fue de 250 nl/min y se llevó a cabo una elución en gradiente. El gradiente variaba de 2% a 90% de fase móvil B (fase móvil A: acetonitrilo al 2%, ácido fórmico al 0,1%; fase móvil B: acetonitrilo al 100%, ácido fórmico al 0,1%). El gradiente duró 250 minutos en el caso de PPD<sub>b</sub> y PPD<sub>a</sub>, y 30 minutos en el caso de P22. El volumen de inyección fue de 5 µl.

Los datos se adquirieron en el sistema TripleTOF usando los siguientes parámetros de operación: voltaje de pulverización de iones, 2300 V; generador de gas, 35; temperatura del calentador de interfaz, 150; gas fuente de iones 1, 25; y potencial de disgregación, 100 V. Los datos se adquirieron en modo de adquisición dependiente de datos (DDA, del inglés Data Depending Acquisition) usando el software Analyst TF 1.7 (AB SCIEX). En el intervalo de masa de 350-1250 Da se llevó a cabo un sondeo de espectrometría de masas (0,25 segundos) seguido de 35 exploraciones de espectrometría de masas en tándem (100 ms) en el intervalo de masa de 100-1800 Da, dando lugar a ciclos de 4 segundos. Los criterios de conmutación fueron la presencia de iones en un recuento mayor de 90 por segundo con cargas de 2-5 y 350 <m/z <1250. Una vez analizados, los iones anteriores se excluyeron durante 15 segundos. La energía de colisión se controló usando un script de energía de colisión DDA.

### 1.4. Análisis de datos

Los datos de la espectrometría de masas (MS) y la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) se procesaron utilizando el software Analyst® TF 1.7 (AB SCIEX). Los datos brutos se convirtieron en archivos mgf, y la búsqueda se realizó en las bases de datos de proteínas del NCBI RefSeq de *M. bovis* AN5 en el caso de bPPD y P22 (15,834 entradas en mayo de 2016) o de *M. avium* subsp. *avium* ATCC 25291 en el caso de PPDa (8.712 entradas en mayo de 2016). Estas búsquedas se realizaron utilizando el motor de búsqueda Mascot Server 2.5.1 (Matrix Science, Londres, Reino Unido) e incluyeron la base de datos invertida correspondiente. Las búsquedas se realizaron con metilación (en cisteínas) como una modificación fija y con las siguientes modificaciones variables: acetilación (en el extremo N-terminal de la proteína), Gln a piro-Glu (extremo N-terminal de la glutamina), Glu a piro-Glu (extremo N-terminal del ácido glutámico) y Oxidación (en la metionina). Se permitió una tolerancia de la masa peptídica de 25 ppm, una tolerancia de la masa del fragmento de 0,05 Da y se permitieron hasta 2 omisiones en el punto de corte de la enzima. La tasa de error (FDR, del inglés False Discovery Rate) tenía que ser  $\leq$  1% para que la identificación del péptido se considerara satisfactoria.

Para evaluar la abundancia relativa de las proteínas en la PPDb, PPDa y P22 se utilizó el método de recuentos de espectros (Blein-Nicolas and Zivy, 2016). El número de espectros de cada proteína se normalizó dividiéndolos por el número total de espectros de la muestra y calcular así el porcentaje de espectros. La abundancia relativa se representó como la media de los replicados  $\pm$  desviación estándar (SD). La capacidad antigénica media (AAP, *Average Antigenic Propensity*) de las proteínas se determinó mediante el método de Kolaskar y Tongaonkar (Kolaskar and Tongaonkar, 1990) (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>) para así poder predecir cuales de ellas pueden inducir una respuesta de anticuerpos. Se considera que un AAP superior a 1.0 estaría asociado a aquellas proteínas candidatas a inducir una potente respuesta humoral. La presencia de proteínas compartidas entre las tres muestras analizadas, PPDb, PPDa y P22, se llevó a cabo utilizando el programa Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>). Para comparar la

secuencia de las proteínas compartidas se utilizó la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las secuencias se obtuvieron a partir de la base de datos del NCBI. Los diagramas de Venn se diseñaron utilizando un programa de libre acceso (<http://omics.pnl.gov/software/VennDiagramPlotter.php>).

### 1.5. ELISA indirecto

Se inmunizaron o ratones BALB/C con PPDb o con PPDa hasta un total de tres inoculaciones por vía intraperitoneal y separadas al menos dos semanas. La reactividad del suero de los dos grupos de ratones se analizó frente a PPDb, PPDa y P22 utilizando un ELISA indirecto similar al descrito en el estudio 1 con algunas modificaciones. Las placas se tapizaron con PPDb, PPDa o P22 a 10 µg/ml durante toda la noche a 4°C y luego se bloquearon con BSA al 2% en PBS. El suero de cada grupo de ratones se analizó por triplicado en diluciones seriadas de ½ (empezando en 1/8) y se incubaron a 37°C durante una hora. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario frente a IgG de ratón conjugado con peroxidasa y el color se desarrolló añadiendo OPD. Para detener la reacción se añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y la densidad óptica se midió a 492 nm. Como control negativo se utilizó una mezcla de sueros de 4 hembras de ratones BALB/c no inmunizados.

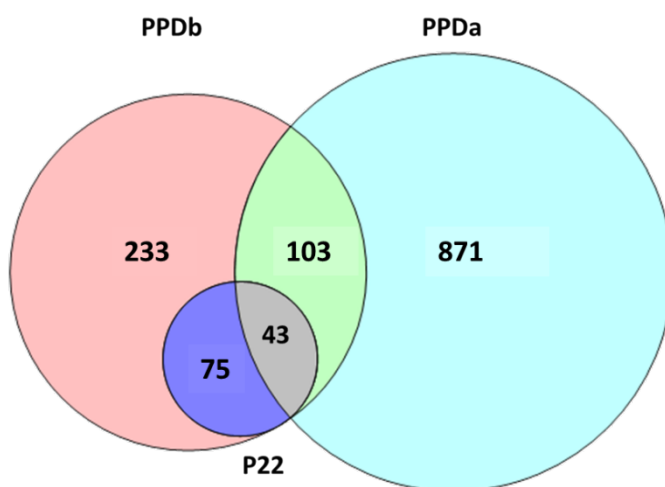
## 2. Resultados y discusión

En este estudio proporcionamos una descripción proteómica detallada de la PPDb y PPDa e identificamos componentes comunes en ambas preparaciones, señalando aquellas proteínas que están probablemente implicadas en la reactividad cruzada. Estos resultados pueden ayudar a mejorar el rendimiento del diagnóstico con la PPDb y, en particular, reducir la reactividad cruzada. Por último, proponemos el producto inmunoderivado de la PPDb menos complejo y más fácilmente estandarizable y que podría sustituirla en las pruebas inmunodiagnósticas, especialmente en ensayos tipo ELISA para la detención de anticuerpos específicos frente a bacterias del complejo *M. tuberculosis*.



### 2.1. Proteínas presentes en las PPDb, PPDa y en la P22

Se identificaron 2,678 péptidos en la PPDb, 6,465 en la PPDa y 492 en la P22. A partir de los cuales se determinaron las proteínas de las que procedían, incluyéndose solo aquellas que cumplieran: (1) que se identificaran al menos dos péptidos únicos y (2) que estuvieran presentes en al menos en dos de los tres replicados. Ello dio como resultado un total de 456 proteínas identificadas en la PPDb, 1.019 en la PPDa y 118 en la P22. Estas corresponden en la PPDb al 8,5% de las secuencias codificadas por el genoma de *M. bovis*, en la PPDa al 23,3 de las codificadas por *M. avium* y de las proteínas identificadas en la P22 correspondían al 1,5% de las secuencias del genoma de *M. bovis*.



**Figura 3.1.** Proteínas identificadas en la PPDb, PPDa y P22, así como proteínas compartidas entre las preparaciones.

El número de proteínas identificadas tanto para la PPDb como para la PPDa en nuestro estudio es muy superior al identificado en estudios previos. Hemos identificado 456 proteínas en la PPDb mientras que en las PPDs de Reino Unido, Brasil y Corea del Sur se identificaron 104, 49 y 271 respectivamente (Borsuk et al., 2009; Cho et al., 2015). Con respecto a la PPDa, se han identificado 1019 proteínas en comparación a las 63 y 57 proteínas detectadas en las PPDa de Reino Unido y Brasil respectivamente (Borsuk et al., 2009). A pesar de que las cepas de las que proceden las PPDs bovinas y aviar son las mismas, las diferencias observadas en el número de

proteínas identificadas podrían ser debido a varios factores entre los que se incluye el proceso diferente de fabricación de PPDs a partir de los cultivos bacterianos, pero, sobre todo, pensamos pueda ser por la utilización de distintos protocolos en el análisis proteómico. En nuestro protocolo se realiza un precipitado de las proteínas y posterior digestión en solución, mientras que en los trabajos anteriormente descritos las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE 1D, se cortaron las bandas y se realizó la digestión enzimática en gel. Además, en nuestro protocolo hemos empleado una carrera de 250 minutos en comparación a los 30 minutos por banda que utilizaron en el estudio anterior. En una mezcla compleja y heterogénea se identifican un mayor número de proteínas utilizando gradientes largos (Hsieh et al., 2013).

En la Tabla 3.1 aparecen descritas las 10 proteínas mayoritarias en la PPD<sub>b</sub>, PPD<sub>a</sub> y P22. Estas 10 proteínas suponen alrededor del 50% en masa del total de proteínas determinadas en la PPD<sub>b</sub> y en la P22, pero no más del 15% de lo referente a la PPD<sub>a</sub>. Es de suponer que gran parte de los anticuerpos inducidos en una infección por *M. bovis* podrían ser detectados si se utilizan como antígenos la PPD<sub>b</sub> o la P22 en pruebas serológicas, ya que presumiblemente estarán dirigidos, aunque no solo, frente a proteínas mayoritarias. La determinación de la concentración mediante métodos libres de etiquetas se ve influenciada por parámetros constitutivos de los equipos utilizados, siendo el más importante la duración del tiempo de exclusión dinámico que afecta significativamente al número de espectros y péptidos detectados en proteínas menos representadas en la muestra (Blein-Nicolas and Zivy, 2016; Zhu et al., 2010). Por lo tanto, esta aproximación cuantitativa sería realista en el caso de PPD<sub>a</sub> donde el valor obtenido para la proteína mayoritaria es de un 2,7% pero está claramente infravalorada en el caso de la PPD<sub>b</sub> donde a la ESAT-6-like protein EsxB (CFP-10) se le asigna una concentración del 12,2% y sobre todo en el caso de la P22 donde obtenemos un valor de un 26% para la MPB70.

**Tabla 3.1.** Diez proteínas más abundantes identificadas en la PPD<sub>b</sub> (A), PPD<sub>a</sub> (B) y P22 (C). Acceso: Código de acceso del NCBI; Abundancia relativa (%): porcentaje del total de proteínas; AAP Average antigenic propensity

A)

Nº	Acceso	Nombre	Abundancia relativa (%)	AAP
1	489495023	ESAT-6-like protein EsxB	12.91	0.9934
2	489495046	6 kDa early secretory antigenic target	8.52	0.9935
3	489509783	Cell surface protein MPB70	7.12	1.0478
4	489513185	Molecular chaperone GroES	3.44	1.0245
5	489509769	Cell surface protein MPB83	3.40	1.0336
6	489497323	Molecular chaperone GroEL	2.62	1.025
7	489516779	ESAT-6-like protein EsxL	1.99	1.0118
8	489503953	ESAT-6-like protein EsxN	1.92	1.0193
9	489504801	Hypothetical protein MPB63	1.90	1.0332
10	489496900	Molecular chaperone DnaK	1.49	1.0157

B)

Nº	Acceso	Nombre	Abundancia relativa (%)	AAP
1	497662805	ModD protein, partial	2.26	1.0175
2	497665169	Molecular chaperone GroEL	1.77	1.0244
3	500044420	PPE family protein	1.74	1.0271
4	497665641	Serine protease	1.53	1.0298
5	489970531	Hypothetical protein	1.37	1.0136
6	489970321	50S ribosomal protein L7/L12	1.35	1.0327
7	497665032	Hypothetical protein	1.32	1.0364
8	497664451	Hypothetical protein	1.31	1.0338
9	4566238	10 kD heat shock protein	1.14	1.0261
10	656316315	Peptidase S1	1.11	1.0264

C)

N°	Acceso	Nombre	Abundancia relativa (%)	AAP
1	489509783	Cell surface protein MPB70	27.59	1.0478
2	489509769	Cell surface protein MPB83	4.52	1.0336
3	489497323	Molecular chaperone GroEL	2.93	1.025
4	489505073	Hypothetical protein	2.44	1.0401
5	489501012	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate- -homocysteine methyltransferase	2.19	1.0402
6	489495023	ESAT-6-like protein EsxB	1.95	0.9934
7	489498552	Elongation factor Tu	1.95	1.0225
8	489495046	6 kDa early secretory antigenic target	1.83	0.9935
9	489505308	Alpha-crystallin	1.59	1.0135
10	489504801	Hypothetical protein MPB63	1.22	1.0332

## 2.2. Análisis cuantitativo y antigénico de las proteínas compartidas

De todas las proteínas identificadas en la PPDb y PPDa, 146 fueron comunes a las dos preparaciones, mostrando un solapamiento del 26,74% y el 17,74%, respectivamente; mientras que la P22 compartía con la PPDa solamente 43 de las 165 proteínas (Figura 3.1). De estas proteínas comunes aquellas que se encontraron a concentraciones superiores al 0,1% (71 en la PPDb, 84 PPDa y 43 en la P22) se sometieron a un análisis de antigenicidad para determinar su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria de tipo humoral. En punto de corte del 0,1% se decidió sobre la base de la concentración de antígenos complejos (formados por numerosas proteínas) que se utilizan habitualmente en los ensayos tipo ELISA indirecto. En estas pruebas se suele utilizar una cantidad de 500 ng de proteínas totales por pocillo, con lo cual el 0,1% de un antígeno individual corresponde a 0,5 ng. Los antígenos que se encuentren por debajo de 0,5 ng influirán muy poco en la densidad óptica final del ensayo. Por consiguiente, nuestra hipótesis es que las proteínas que tendrán una mayor repercusión en el resultado final del ELISA son las que estén por encima del 0,1% de concentración.

En la Tabla 3.2 aparecen descritas las 30 proteínas comunes que presuponemos como causantes de la reactividad cruzada, bien por encontrarse a altas concentraciones en cualquiera de las dos PPDs (iguales o

superiores a 0,1%) o bien por tener un alto AAP (igual o mayor a 1,04). De estas 30 proteínas, en el complejo P22 solo se encuentran presentes 18 de ellas, lo que se puede traducir en una mejora de la especificidad diagnóstica.

**Tabla 3.2.** Proteínas compartidas entre la PPDb, PPDa y P22 que se prevén que pueden contribuir a los fenómenos de reactividad cruzada. Acceso: Código de acceso del NCBI; Abundancia relativa (%): porcentaje del total de proteínas; AAP Average antigenic propensity. El código de acceso del NCBI y el nombre de la proteína aparecen en cursiva en la PPDa y no cursiva en la PPDb.

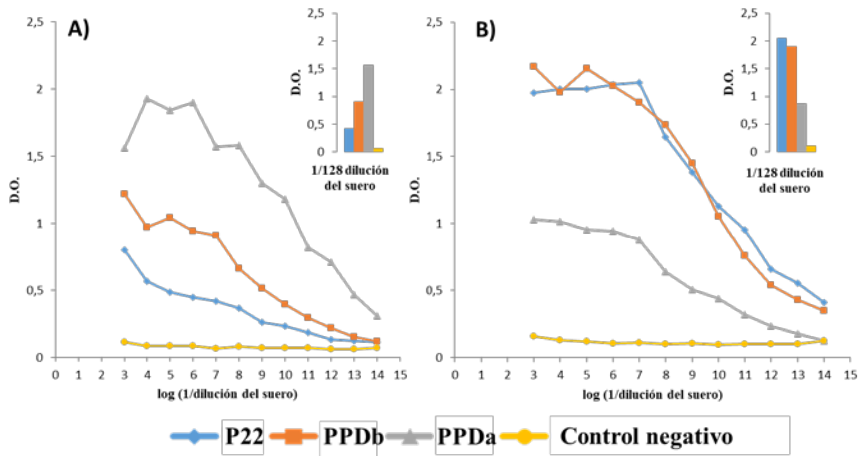
Nº	Acceso	Descripción	Abundancia relativa(%)			AAP		Identidad/ Cobertura
			PPDb	PPDa	P22	PPDb	PPDa	
1	489513185 <i>4566238</i>	Molecular chaperone GroES <i>10 kD heat shock protein</i>	3.44	1.13	1.22	1.0243	1.0261	97/100
2	489497323 <i>497665169</i>	Molecular chaperone GroEL <i>Molecular chaperone GroEL</i>	2.62	1.76	2.93	1.0251	1.0244	94/100
3	489516779 <i>489971186</i>	ESAT-6-like protein EsxL <i>Hypothetical protein</i>	1.99	0.87	1.22	1.0124	1.0238	87/100
4	489503953 <i>489971186</i>	ESAT-6-like protein EsxN <i>Hypothetical protein</i>	1.92	0.87	0.73	1.0193	1.0238	94/100
5	489496900 <i>497665296</i>	Molecular chaperone DnaK <i>Molecular chaperone DnaK</i>	1.49	0.61	0.85	1.0157	1.0149	95/94
6	489500428 <i>489971186</i>	ESAT-6-like protein EsxI <i>Hypothetical protein</i>	1.20	0.87	-	1.0154	1.0238	87/100
7	489498552 <i>489970303</i>	Elongation factor Tu <i>Elongation factor Tu</i>	1.15	0.82	1.95	1.0225	1.0226	97/100
8	489506691 <i>489969124</i>	Meromycolate extension acyl carrier protein <i>Acyl carrier protein</i>	0.84	0.44	-	1.0236	1.0243	92/100
9	489501012 <i>497661234</i>	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate <i>5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate</i>	0.52	0.4	2.20	1.0388	1.0374	86/99
10	499253161 <i>489971186</i>	Secretion protein <i>Hypothetical protein</i>	0.51	0.87	-	1.0113	1.0238	93/100
11	489495992 <i>497665638</i>	Diacylglycerol acyltransferase <i>Diacylglycerol acyltransferase</i>	0.51	0.60	0.61	1.0142	1.0141	85/95
12	489498442 <i>489970321</i>	50S ribosomal protein L7/L12 <i>50S ribosomal protein L7/L12</i>	0.47	1.35	-	1.0392	1.0327	93/100

13	489504572 500042691	Diacylglycerol acyltransferase <i>Diacylglycerol acyltransferase</i>	0.44	0.99	0.85	1.0166	1.0192	81/95
14	489998054 656316315	Serine protease <i>Peptidase S1</i>	0.39	1.11	-	1.0357	1.0264	73/96
15	489503193 497663153	Universal stress protein <i>Universal stress protein</i>	0.36	0.59	0.34	1.0434	1.0431	88/100
16	489504514 489973362	Bacterioferritin <i>Bacterioferritin</i>	0.36	0.79	0.73	1.0193	1.0226	88/100
17	489513178 497664719	Molecular chaperone GroEL <i>Molecular chaperone GroEL</i>	0.31	0.79	0.61	1.0416	1.0399	84/98
18	489509166 497663814	Hypothetical protein <i>Hypothetical protein</i>	0.25	0.89	-	1.0146	1.0152	87/100
19	554796925 489975287	Serine protease <i>Serine protease</i>	0.20	0.54	-	1.0290	1.0317	81/95
20	489496308 564987547	Acyl dehydratase <i>Acyl dehydratase</i>	0.19	0.54	0.73	1.0414	1.0457	80/99
21	489501803 497661528	ATP synthase subunit beta <i>FOF1 ATP synthase subunit beta</i>	0.19	0.53	0.61	1.0239	1.0238	95/98
22	489509098 489972034	Iron-dependent repressor IdeR <i>Dihydrofolate reductase</i>	0.15	0.19	-	1.0362	1.0409	93/100
23	489500222 495529442	Molybdenum cofactor biosynthesis protein <i>Molybdenum cofactor biosynthesis protein</i>	0.13	0.03	0.73	1.0536	1.0476	96/91
24	554793963 497660570	Hypothetical protein O217_19000 <i>Hypothetical protein</i>	0.11	0.30	0.24	1.0490	1.0422	85/89
25	489497388 489970521	Dihydrolipoyl dehydrogenase <i>Dihydrolipoyl dehydrogenase</i>	0.1	0.1	0.37	1.0408	1.0343	90/99
26	489515575 489970131	Hypothetical protein <i>N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase</i>	0.1	0.65	0.24	1.0187	1.0168	82/100
27	489996564 497664056	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase <i>Phosphoglycerate dehydrogenase</i>	0.08	0.27	-	1.0603	1.0551	89/100
28	489997334 497663425	Phosphoglycerate kinase <i>Phosphoglycerate kinase</i>	0.07	0.19	-	1.0415	1.0428	82/88
29	489497373 489970531	Hypothetical protein <i>Hypothetical protein</i>	0.04	1.37	-	1.0209	1.0136	76/100
30	489509867 497663982	KH domain-containing protein <i>KH domain-containing protein</i>	0.02	0.11	-	1.0474	1.0461	95/100

### 2.3. Análisis de la respuesta immune mediada por anticuerpos

Para confirmar nuestra hipótesis de que la P22 podría ofrecer una mayor especificidad que la PPD<sub>b</sub> en serodiagnóstico de tuberculosis por el hecho de compartir menos proteínas con la PPD<sub>a</sub> y que aquellas proteínas compartidas están en menor proporción en la P22, realizamos una aproximación experimental con ratones hiperinmunizados con PPD<sub>b</sub> y PPD<sub>a</sub> que nos permite analizar la reactividad inter e intraespecífica de los tres productos presentados en este estudio: PPD<sub>b</sub>, PPD<sub>a</sub> y P22.

Como aparece en la Figura 3.2A, la reactividad del suero procedente de animales hiperinmunizados con PPD<sub>a</sub> es obviamente mayor frente al antígeno de inoculación, pero el suero presenta reactividad cruzada con la PPD<sub>b</sub> y la P22. En la figura 3.2B está representada la reactividad específica del suero procedente de animales hiperinmunizados con PPD<sub>b</sub> frente a los antígeno PPD<sub>b</sub>, PPD<sub>a</sub> y P22, y al igual que en el caso anterior, vuelve a presentarse una reactividad cruzada con la PPD<sub>a</sub>. En el inserto de la figura aparece representada la reactividad frente a las tres preparaciones a una dilución del suero 1/128, dilución habitual en este tipo de ensayos. Si extrapolamos estos datos a la situación de infección natural donde llevaríamos a cabo un serodiagnóstico, observamos que animales sensibilizados o infectados con *M. avium* y/o con otras micobacterias (y libres de *M. bovis*) podrían ser considerados como falsos positivos debido a la reactividad cruzada interespecífica de las proteínas compartidas. En el extremo opuesto, aquellos animales infectados con *M. bovis* y co-infectados con otras micobacterias, al realizar el diagnóstico comparado PPD<sub>b</sub> y PPD<sub>a</sub>, serían considerados negativos por presentar reactividad frente a ambas, incluso más alta frente a la PPD<sub>a</sub> que a la PPD<sub>b</sub>. En este sentido, el hecho de que la P22 muestre unos valores de sensibilidad iguales o incluso superiores a la PPD<sub>b</sub> en los ensayos tipo ELISAs y de que la especificidad se vea mejorada considerablemente hace de este producto un buen candidato para ser utilizado como antígeno en el serodiagnóstico.



**Figura 3.2.** Reactividad del suero de ratones inmunizados con PPDa (A) o PPDb (B) mediante ELISA indirecto frente a la PPDb, PPDa y P22. Como control negativo se utilizó suero de ratones sin inmunizar (línea amarilla). El inserto representa los resultados obtenidos a una dilución del suero 1/128.

La identificación de animales falsos positivos se atribuye generalmente a una respuesta inmune desarrollada por antígenos homólogos de vacunas o micobacterias ambientales (Harboe, 1981; Huebner et al., 1993). Nosotros en este estudio indentificamos 30 proteínas altamente abundantes y antigénicas que contribuirían, teóricamente a la reactividad cruzada entre PPDa y PPDb (Tabla 3.2). Estos resultados concuerdan con estudios previos de proteómica donde destacan la importancia de las chaperonas DnaK, GroEL y GroES, así como el factor de elongación Tu y acyl carrier protein como responsables de reactividad cruzada (Borsuk et al., 2009; Cho et al., 2012; Cho et al., 2015). Las chaperonas son proteínas que están conservadas entre la mayoría de especies de micobacterias y otras bacterias productoras de enfermedades respiratorias [(Prasad et al., 2013), por lo que pueden ser consideradas como candidatas a inducir una reactividad cruzada, a pesar de que su homología con otras proteínas de mamíferos haga pensar en principio que no sean buenos inmunógenos. Sin embargo, estudios previos al nuestro atribuyen a las chaperonas un papel muy



importante en la respuesta inmune innata y adaptativa, tanto humoral como celular (Colaco et al., 2013; Young et al., 1993).

Es presumible que el análisis de la respuesta T nos llevaría a aproximaciones similares a las halladas en el estudio de producción de anticuerpos, ya que alguna de las proteínas mayoritarias como la MPB70, la MPB83, ESAT-6 o CFP-10 están consideradas como potentes inmunógenos T (Tollefsen et al., 2003; Vordermeier et al., 2007; Vordermeier et al., 2000). Además, no podemos olvidar que el sistema inmune en un sistema complejo donde cada respuesta no puede considerarse independientemente. Ya en 1966, Claman et al, demostraron la interdependencia de la respuesta humoral y celular de tal forma que existe una cooperación entre ambas (Claman et al., 1966). La intervención de múltiples componentes tiene con fin último obtener una respuesta global donde lo importante es la homeostasis del animal y su supervivencia.

### 3. Resumen

Los dos reactivos más utilizados para el diagnóstico de la tuberculosis son la PPD<sub>b</sub> y PPD<sub>a</sub>. A pesar de usarse ampliamente se sabe muy poco de su composición cualitativa y cuantitativa, lo que dificulta su estandarización. Además, la PPD<sub>b</sub> puede dar resultados falsos positivos debido a proteínas homólogas entre *M. bovis* y *M. avium*. Por ello, el objetivo del presente estudio fue llevar a cabo una caracterización proteómica de la PPD<sub>b</sub>, PPD<sub>a</sub> y un producto obtenidos a partir de la PPD<sub>b</sub> mediante cromatografía de afinidad al que llamamos P22 con el fin de identificar aquellas proteínas que contribuyen a la reactividad cruzada entre estos tres productos en el diagnóstico de tuberculosis. Para ello, la PPD<sub>b</sub>, PPD<sub>a</sub> y P22 se analizaron mediante cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas. Por otro lado, se inmunizaron ratones con PPD<sub>b</sub> y PPD<sub>a</sub> y la reactividad del suero de los mismos analizó por ELISA indirecto frente a PPD<sub>b</sub>, PPD<sub>a</sub> y P22.

Hemos: 1) identificado mediante MS las proteínas constituyentes de las tres preparaciones; 2) descrito las proteínas compartidas; 3) realizado el

cálculo aproximado de su concentración en la muestra; 4) analizado la capacidad antigénica, directamente relacionada con la capacidad para inducir una respuesta inmune; y por último, basándonos en los datos obtenidos, 5) propuesto un nuevo compuesto inmunoderivado de la bPPD para ser utilizado en ensayos tipo ELISA en la detección de anticuerpos específicos frente a bacterias del complejo *M. tuberculosis*.

Los resultados presentados en estos dos primeros capítulos son complementarios en tiempo y esencia, de hecho, la mayoría de los experimentos de ambos estudios, proteómico e inmunoproteómico se plantearon y desarrollaron simultáneamente. Ambos estudios nos permitieron considerar una alternativa diagnóstica que se llevó a cabo finalmente en especies animales domésticas y salvajes y cuyos resultados se recogen y discuten en el tercer capítulo.



### **3.3. Capítulo III: desarrollo de nuevos ensayos para el diagnóstico de la tuberculosis bovina.**

#### **Estudio 4: Puesta a punto de los inmunoensayos**

El diagnóstico oficial de la tuberculosis se basa en la determinación de la respuesta inmune Th1 frente a PPD<sub>B</sub> de los animales infectados. Sin embargo, a pesar de los avances realizados en los últimos años en su aplicación se estima que todavía se necesita mejorar la sensibilidad y/o la especificidad de las técnicas disponibles (Bezoz et al., 2014a). En lo que hace referencia a la sensibilidad, existe el consenso de que, bien por la existencia de animales anérgicos, por un uso inadecuado de las técnicas disponibles o bien porque el método empleado no tiene suficiente sensibilidad, se estima que existe un porcentaje de animales que no son correctamente diagnosticados y son entre otras causas las responsables del mantenimiento de la enfermedad (Waters et al., 2017).

Así mismo sería necesario el desarrollo de técnicas laborales multiespecie, robustas y baratas que permitieran obviar los problemas y limitaciones de las técnicas basadas en la respuesta inmune celular y que permitieran el cribado del estatus de la respuesta inmune frente a la tuberculosis de los animales sometidos a programas de erradicación e incluso en aquellos que se encuentren en regiones y países que no disponen de programa de erradicación. Es, por tanto, prioritario, contar con nuevos métodos diagnósticos más sensibles y específicos que permitan disminuir el porcentaje de animales infectados que no son detectados contribuyendo así a la erradicación de la tuberculosis bovina.

A este respecto, la serología constituye, hasta el momento, una técnica complementaria. No obstante, recientemente han surgido nuevas pruebas serológicas basadas en la detección de anticuerpos frente a proteínas específicas de *M. bovis* (O'Brien et al., 2017; Waters et al., 2011a). La determinación de la respuesta serológica varía en función de los antígenos utilizados, siendo MPB70 y MPB83 los más relevantes, ya que son proteínas expresadas exclusivamente por micobacterias del MTBC y altamente

inmunogénicas (Wiker, 2009) lo que hace que estas proteínas sean candidatas para usarse como reactivos para la diferenciación de animales infectados o vacunados con paratuberculosis (DIVA, *Differentiation of Infected and Vaccinated Animals*).

Nuestro trabajo, se orientó en parte, a mejorar el diagnóstico serológico de la tuberculosis bovina. Utilizamos anticuerpos monoclonales por nosotros desarrollados para identificar y purificar antígenos específicos, como el complejo P22 que hemos descrito en capítulos anteriores y también para el diagnóstico post-mortem mediante inmunohistoquímica (IHQ).

## 1. Materiales y métodos

### 1.1. Muestras

En la puesta a punto del ensayo para la detección de anticuerpos específicos se utilizaron sueros procedentes de 4 cabras en las que se confirmó mediante aislamiento e identificación de la micobacteria, una infección natural por *M. caprae*. Para evaluar los AcM en IHQ se utilizaron tejidos procedentes de cabras infectadas experimentalmente con *M. bovis*.

### 1.2. Antígenos de tapizado

- **PPDb.**
- **P22:** producto obtenido a partir de PPDb mediante inmunopurificación con el AcM SIM 377-18
- **HspX:** producto obtenido a partir de PPDb por inmunopurificación con el AcM SIM 394-5.
- **ESAT-6:** producto obtenido a partir de PPDb por inmunopurificación con el AcM SIM 394-9
- **rMPB70:** proteína recombinante comercializada por Lionex GmbH.
- **rMPB83:** proteína recombinante comercializada por Lionex GmbH.

### 1.3. Anticuerpos en IHQ

Los AcM evaluados en IHQ fueron los siguientes:

- **SIM 377-18:** reconoce un epítopo común en MPB70 y MPB83
- **SIM 385-17:** reconoce Meromycolate acyl carrier protein
- **SIM 394-5:** reconoce HspX
- **SIM 394-9:** reconoce ESAT-6

### 1.4 ELISA indirecto

El inmunoensayo se llevó a cabo como se describió en el Capítulo 1 con algunas modificaciones. Las placas se tapizaron con los 6 antígenos a una concentración de 10 µg/ml y se bloquearon con leche desnatada al 5% en PBS; el suero de los animales se diluyó a 1/100 en leche desnatada al 5% en PBS y se analizaron por duplicado; por último, se utilizó como anticuerpo secundario suero policlonal de conejo frente a IgG de cabra conjugado con peroxidasa.

### 1.5. Inmunohistoquímica

Para el análisis inmunohistoquímico contamos con la colaboración de la Dra. María de los Ángeles Riscalde Moya de la Universidad de Córdoba experta en anatomía patológica. Las muestras de pulmón, nódulos linfáticos traqueobronquiales y mediastínicos de cabras infectadas experimentalmente con *M. bovis* se fijaron en formol tamponado al 10% (pH 7,2) durante 24-48 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, tras lavarse en agua destilada, las muestras fueron deshidratadas mediante sucesivos pases por una escala ascendente de alcoholes, aclaradas en xilol e incluidas en parafina. Para ello, se utilizó un procesador de tejidos Leica TP1020 (Wetzlar, Alemania) y un dispensador de parafina Tissue-Tek® TEC® 5 (Sakura Seiki Co., Ltd., Japón). El estudio IHQ se realizaron cortes histológicos de 3-4 µm de grosor, empleando un microtomo rotatorio Microm® modelo HM325, de las muestras incluidas en parafina. Sobre estos cortes se han realizado,

igualmente, la optimización y estandarización de las técnicas inmunohistoquímicas mediante la técnica del complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC) descrita previamente por (Risalde et al., 2015), con algunas modificaciones.

Para desenmascarar los antígenos, las secciones de tejido se analizaron sin tratamiento previo o fueron sometidas a los siguientes pretratamientos:

- Tween 20 (Merck, Munich, Alemania) al 0,1% en solución salina tamponada con fosfato 0,01 M (PBS, pH 7,2) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 0,2% de proteinasa K (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania) en solución salina tamponada con Tris 0,05 M (TBS, pH 7,6) durante 8 minutos a 37 °C.
- Citrato trisódico dihidratado 0,01M (CT) a diferentes pH (3,2, 6 y 9) durante 15 minutos tras la ebullición.
- CT (pH 6) a 121 ° C y 1 atm en autoclave durante 10 minutos.

Como control positivo utilizamos un anticuerpo policlonal de conejo frente a *M. bovis* BCG (Dako, Glostrup, Dinamarca) a una dilución 1:4000 y sin pretratamiento, tal como describió (Munoz-Mendoza et al., 2013). Como controles negativos se utilizaron sueros pre-inmunes de ratón o de conejo. Además, se hicieron ensayos con los AcM en secciones de tejidos de cabras en las cuales no se observaron lesiones compatibles con tuberculosis y el cultivo para bacterias del MTBC fue negativo. Los tejidos utilizados en este estudio fueron evaluados por la Dra. María de los Ángeles Risalde (Tabla 4.1).

## 2. Resultados y discusión

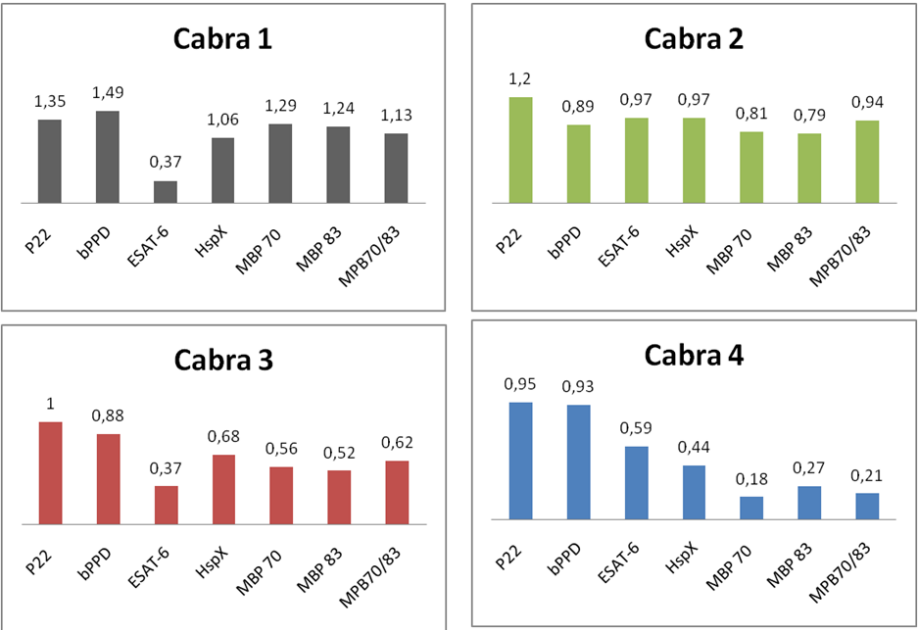
### 2.1. ELISA indirecto frente a los distintos antígenos

En el suero de los 4 animales infectados por *M. caprae*, se determinaron los anticuerpos específicos frente a los 6 antígenos del complejo *M. tuberculosis* descritos: PPD<sub>b</sub>, P22, ESAT-6, HspX, rMPB70 y rMPB83. La representación gráfica de los resultados obtenidos se muestra en la Figura 4.1. Los resultados mostraron que en animales con anticuerpos específicos frente a las proteínas

MPB70/83 el título es el mismo independientemente de que se utilicen las proteínas recombinantes, el complejo P22 o la PPD<sub>b</sub> (cabra 1 y 2). Sin embargo, hay animales que no presentan anticuerpos frente a MBP70/83 o presentan un título bajo (cabras 3 y 4), mientras que sí aparece reactividad cuando se utiliza el complejo P22 y la PPD<sub>b</sub>. Esto lo explicamos por la presencia de anticuerpos en estos animales frente a otras proteínas incluidas en el complejo P22 y PPD<sub>b</sub>, pero distintas a MPB70/83, como ESAT-6 y HspX frente a las que sí presentan reactividad. En el caso de utilizarse las proteínas recombinantes como antígeno, estos animales serían erróneamente diagnosticados como negativos a tuberculosis, mientras que al utilizarse el complejo P22 se diagnosticarían correctamente como animales positivos (cabras 3 y 4). En esta prueba no se incluyó *meromycolate acyl carrier protein* porque es una proteína compartida con la PPD<sub>a</sub> y, por tanto, no es útil para el diagnóstico diferencial del MTBC respecto del MAC.

La principal ventaja que supone el antígeno P22 es que teniendo similar sensibilidad que la PPD<sub>b</sub> ofrece una mayor especificidad en el serodiagnóstico de tuberculosis, atribuible al hecho de compartir menos proteínas con la PPD<sub>a</sub> (43 vs 145 de PPD<sub>b</sub>) y que aquellas proteínas compartidas están en menor proporción en la P22, como ha quedado demostrado en el Capítulo II.





**Figura 4.1.** Reactividad (D.O) del suero de 4 cabras infectadas por *M. caprae* frente a distintos antígenos del complejo *M. tuberculosis*.

Estudios previos al nuestro consideran que se deben utilizar más de una proteína en el diagnóstico de TB en animales ya que aumenta la sensibilidad de la técnica (O'Brien et al., 2017; Souza et al., 2012). P22, al ser un complejo proteico formado entre otras proteínas, por ESAT-6, MPB70, MPB83 y HspX, resulta más útil en el serodiagnóstico que las proteínas recombinantes MPB70/83 solas o en combinación. Nuestros resultados muestran que algunos animales, aun siendo negativos a rMPB70/83 resultan positivos a P22, siendo responsables de esta reactividad otras proteínas como ESAT-6 y/o HSPX que forman parte del complejo. Aunque MPB70 y MPB83 son las proteínas más relevantes en la respuesta inmune humoral, otras proteínas como ESAT-6, CFP10 o HspX también inducen anticuerpos en animales infectados, aunque en un porcentaje menor que MPB70/83 (O'Brien et al., 2017; Souza et al., 2012). En nuestro estudio obtenemos resultados similares, ya que otras proteínas como ESAT-6 y HSPX inducen una respuesta inmunológica tanto en ratones inmunizados como cabras infectadas. Sin embargo, en estudios previos los animales que presentaban anticuerpos frente a ESAT-6

tienen títulos elevados frente a MPB70 y MPB83 (O'Brien et al., 2017). Estos resultados contrastan con los nuestros, donde observamos que hay animales que presentan anticuerpos frente a ESAT-6, pero no frente a MPB70/83.

## 2.2. Inmunohistoquímica

El anticuerpo policlonal frente a BCG mostró un patrón de tinción difuso en todos los tipos de granulomas tuberculosos observados. Los granulomas mostraron grandes cantidades de células positivas con una tinción intracitoplasmática débil. Estas células de tamaño variable se identificaron como macrófagos (MΦs) epitelioides, junto con MΦs y células gigantes de Langhan (Figura 4.2 A, B). Curiosamente, se observó un marcaje difuso, débil y no específico para este anticuerpo en el epitelio bronquial, así como en el tejido conectivo que rodea los vasos sanguíneos, el de las cápsulas y septos de los nódulos linfáticos.

En la tabla 4.1 se describen las diferentes condiciones evaluadas y seleccionadas para el estudio.

**Tabla 4.1.** Reactividad producida por los AcM anti PPD<sub>b</sub> en tejidos de cabras infectadas experimentalmente con *M. bovis* fijados en formol tamponado al 10% y sometidos a distintos pretratamientos para desenmascarar los antígenos.

Dilución del AcM		Pretratamiento						
		sin pretratamiento	Tween 20	Proteinasa K	Autoclave pH6	Microondas		
						pH 3,2	pH 6	pH 9
SIM 377- 18	-	++ F	+ F	-	+ +F	+	+ F	+
	1:20	+++*	++	-	++	+	++	+
	1:100	+	+	-	+	+	++	+
	1:200	+	+	-	-	-	-	-
SIM 394- 9	-	F	F	F	F	F	F	F
	1:20	F	F	F	F	F	F	F
	1:100	F	F	F	F	F	F	F
	1:200	F	F	F	F	F	F	F

	-	+ F	F	-	+	-	++F	-
SIM	1:20	F	F	-	-	-	++*F	-
394-	1:100	-	-	-	-	-	-	-
5	1:200	-	-	-	-	-	-	-
	-	+ F	F	-	+	-	+F	-
SIM	1:20	F	F	-	-	-	++*	-
385-	1:100	-	-	-	-	-	-	-
17	1:200	-	-	-	-	-	-	-

-, sin reactividad; + positividad leve sin ruido de fondo; ++, positividad moderada sin ruido de fondo; +++, intensa positividad sin ruido de fondo; F, negativo con un intenso ruido de fondo; + F, positivo con ruido de fondo.

\* Dilución y pretratamiento de elección para cada AcM.

El marcaje con el AcM SIM 377-18 fue similar al marcaje con el anticuerpo policlonal frente a BCG, aunque curiosamente la tinción de las células gigantes de Langhan con este AcM fue más limitada (Figura 4.2 C). En los granulomas no necróticos, se observó un mayor número de MΦs y MΦs epitelioides positivos a este anticuerpo (Figura 4.2 D), mientras que en los granulomas necróticos también se observó una ligera tinción generalizada en el caseum (Figura 4.2 E). Así mismo, en granulomas fibrocalcificados con material mineralizado rodeado de tejido fibrótico y un limitado número de células inflamatorias, este AcM presentó un patrón de tinción de tipo fibroso (Figura 4.2 F). Usando este AcM, también se observó una tinción inespecífica en el tejido conjuntivo que rodea los vasos sanguíneos, cápsula y septos de los nódulos linfáticos, aunque con una menor intensidad que la observada para el anticuerpo comercial anti-BCG.

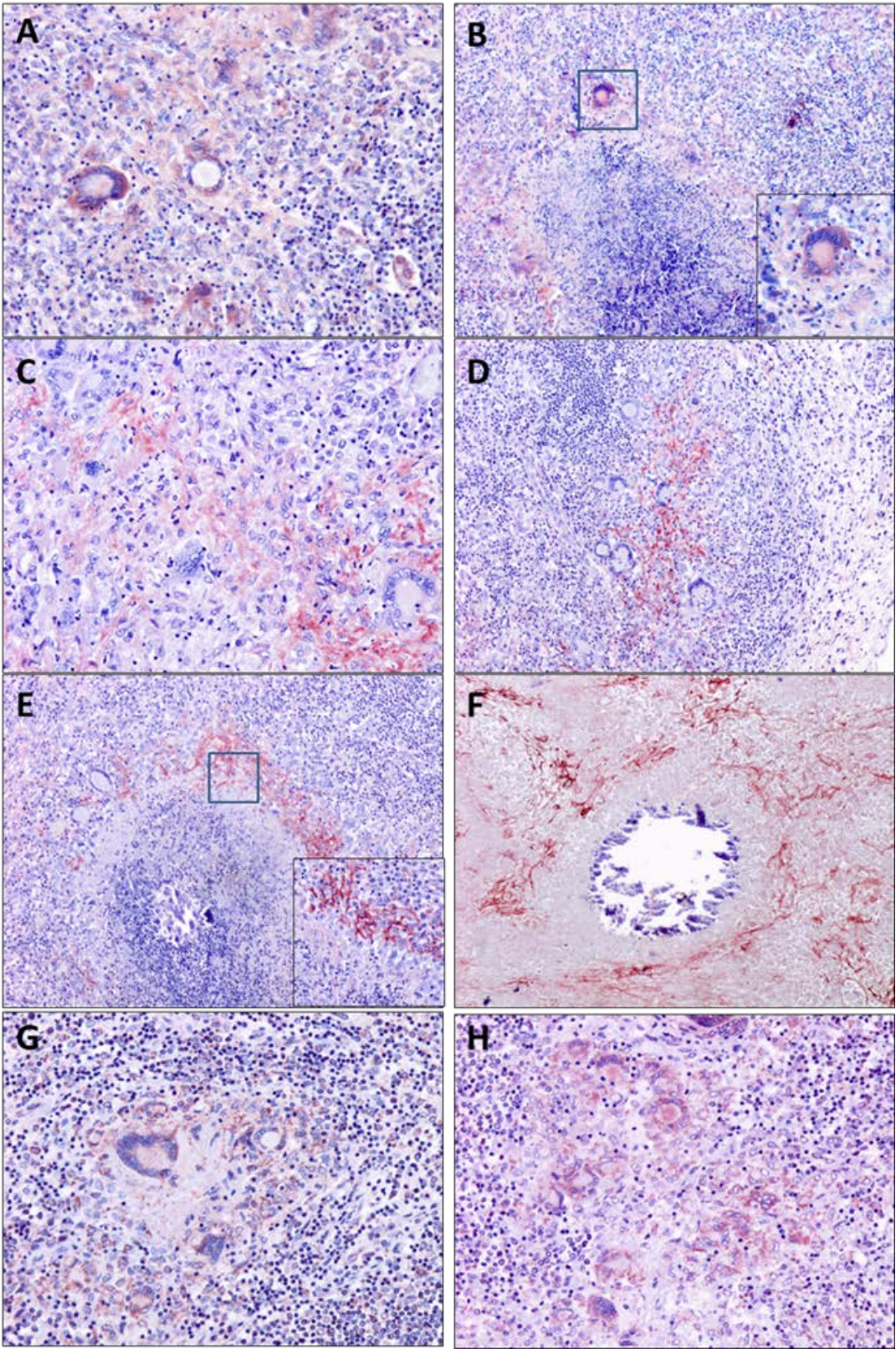
El marcaje con los AcM SIM 385-17 y SIM 394-5 mostró un patrón granular en el citoplasma de los MΦs epitelioides en la interfaz caseum-MΦs, y en las células gigantes de Langhan del área más externa del granuloma (Figura 4.2 G, H). El marcaje con estos dos AcM mostraron un mayor ruido de fondo con patrones de tinción no específicos que el AcM SIM 377-18. En el

caso del AcM SIM 394-9 no se observó ningún tipo de tinción específica a las concentraciones y pretratamientos probados, sino una tinción inespecífica y con ruido de fondo generalizado.

Por otro lado, en los tejidos procedentes de cabras control, no infectadas con micobacterias del MTBC, no se observaron tinciones específicas para estos AcM.

En este estudio se han obtenido una colección de AcM que reconocen componentes exclusivos de la bPPD y cuyo papel en la localización de antígenos de micobacterias del MTBC ha sido evaluado por IHQ.





**Figura 4.2.** Tinción inmunohistoquímica utilizando los distintos AcM sobre tejidos de cabras infectadas experimentalmente por *M. bovis* fijados con formol. Con el anticuerpo anti-BCG se observa una tinción difusa en MΦs epiteloideas junto con MΦs y células gigantes de Langhan en un granuloma no necrótico (A) y necrótico (B). MΦs y MΦs epiteloideas, pero no células gigantes de Langhan, marcadas con SIM 377-18 (C), en un granuloma no necrótico (D) y un granuloma necrótico (E), así como una intensa tinción de antígenos residuales observados un granuloma fibroso (F). Tinción granular mostrada por el AcM SIM 394-5 en MΦs epiteloideas, MΦs y células gigantes de Langhan en el centro de un granuloma no necrótico (G). Tinción muy intensa y granular de células gigantes de Langhan, MΦs y MΦs epiteloideas por el AcM SIM 385-17 en un granuloma no necrótico (H). Inmunohistoquímica realizada con el método ABC y contrateñida con hematoxilina.

Existen numerosos estudios en los que se ha evaluado la aplicación de IHQ utilizando anticuerpos policlonales para el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas, entre las que se encuentra la tuberculosis, como alternativa a los métodos tradicionales de tinción de bacterias alcohol-ácido resistentes (Munoz-Mendoza et al., 2013; Purohit et al., 2007; Sumi and Radhakrishnan, 2009). Nuestro estudio evalúa la posible aplicación de AcM para la detección de antígenos específicos del MTBC mediante AcM en secciones de pulmón y nódulos linfáticos de cabras infectadas con *M. bovis* fijadas con formol y embebidas en parafina. La tinción de nuestros AcM se comparó con un anticuerpo policlonal comercial frente a la BCG, siendo únicamente el AcM SIM 377-18 el que mostró una tinción similar al anticuerpo comercial. Sin embargo, este anticuerpo policlonal no está disponible actualmente, por lo tanto, es necesario desarrollar una alternativa adecuada para el diagnóstico inmunohistoquímico del MTBC. El marcaje con SIM 377-18 presenta una gran cantidad de células positivas, aunque MΦs, MΦs epiteloideas y algunas células gigantes de Langhan's de los granulomas tuberculosos presentan una tinción citoplásmica débil. Así, a pesar de que las células gigantes de Langhan's parecen haber perdido la capacidad de capturar bacterias, han mantenido su capacidad de presentar antígenos (Lay et al., 2007). No se observó ninguna tinción específica para el AcM frente a ESAT-6, a diferencia de estudios previos en los que se presentó un anticuerpo policlonal anti-ESAT-6 muy sensible y específico (Sumi and Radhakrishnan, 2009).

Por lo tanto, nuestros hallazgos sugieren que el AcM SIM 377-18 podría tener una potencial aplicación para el diagnóstico post-mortem de animales tuberculosos mediante IHQ. Esta técnica permite una evaluación detallada de la distribución antigénica en los órganos y células diana, lo que le supone una herramienta de suma importancia para investigar la patogénesis de la infección por micobacterias del MTBC. Además, hay que tener en cuenta la importancia de la detección del MTBC en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina, ya que la mayoría de los servicios de diagnóstico anatomopatológico utilizan formol como fijador de muestras durante largos periodos de tiempo que permitirá la realización de estudios retrospectivos.

### **3. Resumen**

Aunque el diagnóstico de la tuberculosis esté basado en la respuesta inmune celular, la respuesta inmune humoral está adquiriendo cada vez mayor relevancia. Sin embargo, no existen antígenos que permitan un diagnóstico serológico preciso. En el Capítulo 1 ya expusimos como purificamos a partir de la PPD<sub>B</sub> el complejo proteico P22 y como al utilizar este complejo como antígeno de reconocimiento por anticuerpos observábamos una alta respuesta humoral en el suero de los ratones. Por ello, evaluamos al complejo P22 como nuevo antígeno para ser utilizado en el serodiagnóstico de tuberculosis, frente a otros tradicionalmente utilizados, resultando ser más sensible que las proteínas recombinantes MPB70 y MPB83.

Además, hemos evaluado la especificidad y sensibilidad del AcM SIM 377-18 (anti MPB70/83), del AcM SIM 385-17 (anti meromycolate acyl carrier protein), del SIM 394-5 (anti HspX) y del AcM SIM 394-9 (anti ESAT-6) mediante IHQ en cortes de tejidos procedentes de animales tuberculosos. Mientras que el primero ha demostrado tener un gran potencial diagnóstico, el anti HspX solamente puede ser utilizado en condiciones muy restrictivas y el anti ESAT-6 fue totalmente negativo.



## Estudio 5: validación de un ELISA indirecto basado en P22 para el diagnóstico de la tuberculosis en especies domésticas y salvajes

La tuberculosis en el ganado bovino está sometida a un programa de control cuyo fin último es la erradicación de la enfermedad. Para alcanzar este objetivo, hay que tener presente las características epidemiológicas de la enfermedad como es que el agente etiológico afecta a una gran variedad de especies, tanto domésticas como salvajes y que las primeras están en estrecho contacto con las segundas, las cuales actúan como reservorios. Los reservorios más importantes de *M. bovis* en España son el ciervo (*Cervus elaphus*), el jabalí (*Sus scrofa*) y el tejón (*Meles meles*), por lo que el diagnóstico de la tuberculosis en estos animales resulta crucial para la erradicación de la enfermedad (Gortazar et al., 2017; Pesciaroli et al., 2014). Por lo tanto, para poder controlar la enfermedad, entre otras medidas, se debe establecer un diagnóstico eficaz y precoz en ambos compartimentos doméstico y salvaje.

Aunque las pruebas de diagnóstico oficiales se basan en inmunidad mediada por células (IDTB y prueba de detección de IFN- $\gamma$ ), hay muchos estudios que destacan la importancia de la serología como herramienta de diagnóstico para mejorar la detección de animales infectados (Bezoz et al., 2018; Casal et al., 2017; Waters et al., 2017). De hecho, se alcanza mejores resultados mediante la interpretación en paralelo de una prueba de base humoral y otra de base celular (Casal et al., 2017; Chambers, 2013; Chambers et al., 2011; Green et al., 2009; Waters et al., 2015; Whelan et al., 2010). Por ello, la serología supondría una herramienta adicional para el diagnóstico de la enfermedad. Además, la mayoría de las pruebas diagnósticas basadas en la detección de anticuerpos presentan una serie de ventajas como: rapidez, bajo coste, posibilidad de analizar gran número de muestras en poco tiempo y poder realizar estudios retrospectivos. Estudios recientes destacan al serodiagnóstico como una herramienta útil para detectar animales infectados en especies domésticas como cabras (Bezoz et al., 2018), ovejas (Munoz-Mendoza et al., 2016), vacas (Casal et al., 2017), cerdos (Cardoso-



Toset et al., 2017) y camélidos de Sudamérica (llamas y alpacas) (Bezoz et al., 2013; Lyashchenko et al., 2011; Rhodes et al., 2012); y salvajes como ciervos (Busch et al., 2017), jabalíes (Boadella et al., 2011a) y tejones (Aznar et al., 2014). Sin embargo, los reactivos y ensayos disponibles actualmente no son suficientemente sensibles y/o específicos.

Con el fin de proporcionar nuevas opciones más sensibles y específicas para el diagnóstico de animales infectados por el complejo *M. tuberculosis*, hemos desarrollado un ELISA para la detección de anticuerpos específicos utilizando como antígeno el complejo multiproteico P22. Este complejo, a pesar de estar integrado por una treintena de proteínas cuantitativamente importantes, se aleja mucho de las 456 proteínas de la PPDb, muchas de las cuales, además, están presentes también en la PPDa, pero solo algunas en el P22, lo que confiere a este P22 una disminución de la reactividad cruzada y por tanto una mayor especificidad como se ha mostrado en los estudios 1, 2 3 y 4.

El objetivo del estudio 5 fue la validación de un ensayo serológico para el diagnóstico de la tuberculosis en las distintas especies domésticas y salvajes. Este estudio ha sido realizado en las 5 especies de animales domésticos (ganado vacuno, cabras, ovejas, cerdos y alpacas) mediante una colaboración entre el Instituto de Salud Carlos III, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC) y VISAVET y en en tejones en colaboración con el Animal and Plant Health Agency (APHA) del Reino Unido.

## 1. Materiales y métodos

### 1.1. Desarrollo del ELISA indirecto basado en el complejo proteico P22

Para la detección de anticuerpos específicos frente al complejo *M. tuberculosis* desarrollamos un ELISA indirecto utilizando como antígeno el complejo proteico P22.

El ELISA es el descrito en el Capítulo 1 con pequeñas modificaciones. Brevemente, las placas se tapizaron con 10 ug/ml de P22 durante toda la noche, se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5% en PBS. Después de tres lavados con PBST, se añadieron los sueros por duplicado a una dilución

1:100 en leche desnatada y se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. La dilución óptima del suero de cada especie se determinó previamente evaluando la reactividad del suero en diluciones seriadas desde 1:10 hasta 1:640. El anticuerpo secundario utilizado para cada especie, la dilución y el tiempo de incubación aparecen indicados en la Tabla 5.1. Cada anticuerpo secundario se tituló en diluciones seriadas de 1/2 desde 1:1.000 a 1:8.000 para determinar la dilución óptima. El color se desarrolló mediante la adición de 100 µl FAST-OPD incubados en oscuridad y a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3 N) y la D.O. se midió a 492 nm.

**Tabla 5.1.** Anticuerpos secundarios empleados en el ensayo serológico: dilución, tiempo de incubación, anticuerpo secundario y tiempo de revelado en el ELISA indirecto para cada especie.

Especie	Anticuerpo secundario		OPD
	Dilución	Tiempo de incubación (min)	Tiempo de revelado (min)
Bovinos	1/4.000	30	6
Cabras	1/2.000	30	15
Ovejas	1/2.000	30	6
Cerdos	1/20.000	45	15
Tejones	1,5 µg/ml	30	15
Alpacas	1/4.000	30	15

El control negativo de cada especie se obtuvo de animales libres de tuberculosis previamente descritos como cultivo negativo de *M. bovis* de áreas libres de tuberculosis y se incluyó en cada placa por cuadruplicado. Los

## Estudios experimentales

controles positivos se obtuvieron de animales previamente descritos como infectados (positivos a cultivo bacteriológico de *M. bovis*).

### 1.2. Tratamiento de los datos

Los resultados de la muestra se expresaron, basándonos en el trabajo de Boadella et al (2011), como porcentaje de ELISA (E%), calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{E\% de la muestra} = \frac{\text{D.O. media de la muestra}}{2 \times \text{D.O. media del control negativo}} \times 100$$

La especificidad se calculó en una población libre de tuberculosis mediante la siguiente fórmula:  $[\text{Sp} = \text{verdaderos negativos} / (\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}) \times 100]$ . La sensibilidad se calculó en una población de animales infectados de tuberculosis mediante la fórmula  $[\text{Se} = \text{verdaderos positivos} / (\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}) \times 100]$ . El punto de corte se calculó utilizando un análisis ROC (*Receiving Operating Curve*) y se definió como el punto en el que se obtuvo la mayor suma de sensibilidad y especificidad (Aurtenetxe et al., 2008). En algunas situaciones, de forma alternativa, se utilizó un segundo punto de corte en el que la especificidad fue máxima. La sensibilidad, especificidad, valores predictivos y área bajo la curva (AUC, *Area Under the Curve*) se evaluaron siguiendo los criterios descritos por Zou KH (2007) y Van Stralen (2009) (van Stralen et al., 2009; Zou et al., 2007)

### 1.3. Análisis estadístico

Las diferencias significativas entre grupos se calcularon usando Chi-Cuadrado de Pearson, U de Mann-Whitney o prueba exacta de Fisher y para cada porcentaje se computó el intervalo de confianza de Wilson del 95% (95% IC). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando SPSS Statistics 20 (IBM, Nueva York, NY, EE. UU.) e interpretados considerando un valor de *p* de 0,05 para determinar la significación estadística.

#### 1.4. Población de estudio

##### **Bovinos:**

La sensibilidad del ensayo en ganado bovino se calculó en una explotación con alta prevalencia en tuberculosis (Casal et al., 2017). Para determinar la especificidad se utilizaron muestras procedentes tanto de Noruega como de España. Noruega es un país OTF, y por tanto las vacas no han seguido un programa de erradicación y no se han tuberculinizado. Todas las muestras de Noruega se consideraron negativas. En España (no OTF), el estudio de especificidad se realizó en una zona libre de una Comunidad Autónoma de baja prevalencia de tuberculosis y en rebaños históricamente libres de la enfermedad pero que se tuberculinizan 2 veces todos los años.

El número, origen y características de los sueros empleados en este estudio están resumidos en la Tabla 5.2. Todos los sueros procedentes de Noruega fueron proporcionados por el Dr. Johan Åkerstedt del Instituto Veterinario de Noruega. Las muestras de ganado vacuno se recogieron en 2015 como parte de los programas de vigilancia de la diarrea vírica bovina (BVD).

##### **Caprinos:**

La determinación de la sensibilidad del ELISA P22 en cabras se realizó en una explotación de alta prevalencia de tuberculosis (Bezoz et al., 2018).

Para calcular la especificidad se usaron sueros procedentes de Noruega y de España. Los primeros se recogieron como parte de los programas de vigilancia de *Brucella melitensis* en 2015. Treinta y seis de las 100 muestras provenían de rebaños vacunados con paratuberculosis (Gudair) y las otras muestras eran animales no vacunados. En España, todas las cabras fueron vacunadas frente a paratuberculosis con una dosis única de 1 ml de Gudair (CZ Veterinaria, Porriño, España).

##### **Ovinos:**

La sensibilidad del ELISA P22 en ganado ovino se determinó en colaboración con la Dra. Ana Balseiro Morales en el Servicio Regional de Investigación y

Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) del Principado de Asturias y el Dr. Christian Gortázar en el IREC.

La evaluación de la especificidad en esta especie se realizó en sueros noruegos que se recogieron como parte de los programas de vigilancia de maedi en 2015 y en un rebaño español donde se aisló *C. pseudotuberculosis*.

**Porcino:**

La evaluación de la sensibilidad del ELISA P22 en el ganado porcino se llevó a cabo en colaboración con el IREC por Jobin Thomas.

La especificidad se evaluó en muestras libres de tuberculosis procedentes de Noruega que se recogieron como parte de los programas de vigilancia de infecciones víricas específicas en el año 2013 y dos rebaños de la cabaña española sin antecedentes de tuberculosis

**Tabla 5.2.** Número, origen y características de las muestras utilizadas para evaluar la especificidad del ELISA en este estudio.

Noruega						
	Nº de rebaños	Nº de animales	Media de animales por rebaños ± SD	Vacunación frente a paratuberculosis	Última IDTB (meses)	Estado de tuberculosis en el rebaño
Bovinos	212	500	66,3 ± 64.5 <sub>1</sub>	NO	-	Libre
Cabras	50	100	144,7 ± 84.4 <sub>2</sub>	SI**	-	Libre
Ovejas	82	100	102,6 ± 70.0 <sub>3</sub>	NO	-	Libre
Cerdos	18	100	825 ± 1221 <sub>4</sub>	NO	-	Libre

España						
	Nº de rebaños	Nº de animales	Media de animales por rebaños ± SD	Vacunación frente a paratuberculosis	Última IDTB (meses)	Estado de tuberculosis en el rebaño
<b>Bovinos</b>	9	1014	112,6 ± 94.7	NO	3	Libre desde 2012
<b>Cabras</b>	2	123	61,5 ± 9.2	SI	11/1*	Históricamente libre
<b>Ovejas</b>	1	395	395	NO	-	Sin precedentes
<b>Cerdos</b>	2	100	50 ± 0	NO	-	Sin precedentes

\* El rebaño 1 once meses (históricamente libre de tuberculosis) y el rebaño 2 un mes (región libre de tuberculosis).

\*\* Vacunación en nueve regiones del sur de Noruega.

### Llamas y alpacas:

La validación del ELISA en estas especies se desarrolló en dos etapas: en la primera etapa se elaboró un panel preliminar de muestras procedentes de animales libres de tuberculosis y naturalmente infectados por *M. bovis* para así establecer el punto de corte óptimo y calcular la sensibilidad y la especificidad del ELISA. En una segunda etapa, y cuyo objetivo era la validación de nuestro ensayo se usaron muestras procedentes de dos granjas que padecían infección clínica de TB en diferentes situaciones epidemiológicas

#### *Evaluación de especificidad y sensibilidad:*

La especificidad del ELISA se evaluó en dos explotaciones libres de tuberculosis de llamas y alpacas localizadas en distintas regiones de Perú (Bezoz et al., 2014b). El primer rebaño estaba localizado a 4200 m de altitud en la región de Puno y el segundo a 4000 m de altitud en la región de La

Libertad. En total se evaluaron 120 alpacas (104 machos y 16 hembras) y 40 llamas (todas hembras). Ambos rebaños se consideraron libres de tuberculosis por ser históricamente libres, no tener lesiones compatibles con tuberculosis y por estudios epidemiológicos previos. Además, se incluyó un rebaño libre de tuberculosis del sur de Inglaterra formado por 236 animales, 93 machos y 143 hembras.

La sensibilidad se evaluó utilizando sueros de animales (n=56) procedentes de un rebaño localizado en la zona central de España donde se detectó un brote producido por *M. bovis*. El rebaño estaba formado por alpacas de las razas Suri y Huacaya y no se había detectado ningún caso de tuberculosis hasta este brote. En diciembre de 2011, los veterinarios de campo detectaron signos clínicos (anorexia, caquexia y dificultad respiratoria) y muertes repentinas en tres alpacas. En la necropsia se observaron lesiones compatibles con tuberculosis en una de esas alpacas y posteriormente se confirmó la infección por *M. bovis* mediante cultivo bacteriológico (Bezós et al., 2013). En total 67 animales fueron sacrificados y sometidos a un examen post-mortem. En el estudio se incluyeron aquellos animales con cultivos positivos de *M. bovis* y/o presencia de lesiones visibles compatibles con tuberculosis (n=56) para evaluar la sensibilidad. Las muestras de suero para la detección de anticuerpos específicos se recogieron antes de la inoculación con PPD<sub>b</sub> y 15 días después.

### *Prueba del ELISA en condiciones de campo en dos brotes de tuberculosis*

Las muestras de los dos brotes de tuberculosis de Inglaterra fueron proporcionadas por Claire E. Whitehead de Camelid Veterinary Services. El estudio se llevó a cabo en un rebaño en el que se había detectado una infección natural por *M. bovis* (rebaño A) y otro rebaño en el que se había confirmado una infección por *M. microti* (rebaño B). En ambos rebaños, la infección se confirmó por la presencia de lesiones compatibles con tuberculosis y/o cultivo microbiológico.

El rebaño A estaba formado por 88 animales de raza Huacaya. En noviembre de 2016 se detectaron dos animales que presentaban signos clínicos compatibles de tuberculosis. La necropsia mostró lesiones

compatibles con tuberculosis y se aisló *M. bovis* en ambas alpacas. Posteriormente todo el rebaño fue sometido a IDTB y una tercera alpaca fue sacrificada debido a un resultado positivo a la prueba en piel. También se aisló *M. bovis* en la necropsia. En el rebaño B se detectó el brote de tuberculosis en mayo de 2017. El rebaño estaba formado por 25 animales, 22 alpacas de la raza Suri (2 machos y 19 hembras), una alpaca Huacaya macho y dos llamas machos. Tres animales fueron positivos a la IDTB y se sacrificaron. En la necropsia se detectaron lesiones compatibles con tuberculosis y se aisló *M. microti* en el cultivo microbiológico.

### Tejones:

*Muestras de sueros de tejones experimentalmente infectados de tuberculosis procedentes de Reino Unido:*

Las muestras procedentes de Reino Unido fueron proporcionadas por la Dra. Sandrine Lesellier. Los sueros procedían de animales infectados experimentalmente, fueron 36 tejones capturados de los que se obtuvieron muestras 7 días antes de empezar el estudio, a tiempo 0 (antes del desafío), y a 15, 30, 45, 60 y 75 días post-infección (dpi) (Tabla 5.3). Todos los animales presentaron lesiones tuberculosas visibles a los 75 dpi y en todos ellos se aisló *M. bovis* de los tejidos de la necropsia.

*Muestras de sueros de tejones infectados naturalmente o libres de tuberculosis procedentes de Irlanda:*

Estas muestras fueron proporcionadas por el Dr. Eamonn Gormley. Los sueros procedían de 53 animales capturados al final de un estudio de campo a los que se les realizó la necropsia (Gormley et al., 2017). Los animales fueron clasificados como positivos para tuberculosis si presentaban lesiones visibles compatibles con tuberculosis, bacilos acidorresistentes en la tinción de Ziehl-Neelsen o si en alguno de los tejidos cultivados se aislaba *M. bovis* (n=25). El resto de animales fueron considerados libres de tuberculosis (n=28) (Tabla 5.3).

*Muestras de sueros de animales libres de tuberculosis procedentes de España:*



Las muestras procedentes de España fueron proporcionadas por la Dra. Ana Balseiro Morales. Estas muestras corresponden a 32 tejonos capturados en Asturias que fueron negativos para la prueba de detección del IFN- $\gamma$  (Tabla 5.3). Estos hallazgos, junto con la baja prevalencia de tuberculosis en bovinos y en tejonos en la zona (Balseiro et al., 2011), nos permitieron clasificar estos animales como negativos para tuberculosis.

**Tabla 5.3.** Número, origen y características de las muestras de tejonos utilizadas en el estudio.

Pais	Nº de animales	Muestreos	Muestras positivas	Muestras negativas	Vía de infección
Reino Unido	36	7 <sup>a</sup>	n= 34	n= 36	Experimental (bronquial)
Irlanda	53	1	n= 25	n= 28	Natural
España	32	1	-	n= 32	-

## 2. Resultados

### 2.1. Determinación del punto de corte óptimo

El análisis ROC mostró el valor diagnóstico del ELISA P22 en las distintas especies. El valor de corte se definió como la relación entre la D.O. media de la muestra y el doble de la D.O. media del control negativo. El E%= 100 mostró el mejor equilibrio entre sensibilidad y especificidad y, por lo tanto, se eligió como punto de corte de 100% para el ELISA P22. El punto de corte de E%=150 mostró una especificidad máxima, sobre todo en poblaciones de cabras vacunadas frente a paratuberculosis y por tanto se eligió como punto de corte alternativo.

Los valores de sensibilidad, especificidad y el AUC con sus respectivos intervalos de confianza del 95% para el punto de corte elegido de 100% aparecen resumidos en la Tabla 5.4 para cada una de las especies analizadas.

**Tabla 5.4.** Sensibilidad (%), especificidad (%) y área bajo la curva (AUC) con el intervalo de confianza al 95% con E%=100 para el ELISA indirecto en distintas especies.

Especie	Sensibilidad	Especificidad	AUC
<b>Bovinos</b>	85,5 (78.4–90.5)	95 (94,7-98,3)	0,85
<b>Caprinos</b>	85,4 (76.1–91.4)	90,8 (81,6-95,1)	0,80
<b>Ovinos</b>	100 (88,2-100)	95 (92,6-96,8)	0,95
<b>Porcinos</b>	78,1 (72,9-82,3)	100 (96,3-100)	0,89
<b>Llamas y alpacas</b>	62.5 (49,4-74)	100 (99,1-100)	0,91
<b>Tejones</b>	81 (65-92,4)	83,7 (72,3-94,5)	0,76

## 2.2. Ganado bovino

La sensibilidad de los ELISAs indirecto en el ganado vacuno se calculó en una explotación de alta prevalencia de tuberculosis. Estos resultados forman parte de un estudio ya publicado (Casal et al., 2017).

Los datos de especificidad (Tabla 5.3) variaron entre el 92,5 y el 99,4% dependiendo del punto de corte utilizado y el origen de las muestras (España o Noruega). Empleando como punto de corte 100%, la especificidad fue significativamente mayor en sueros procedentes de Noruega que en los sueros de la cabaña española. Sin embargo, cuando el punto de corte se incrementó a 150% no se observaron diferencias significativas. El cálculo de la mediana del E%, más indicada en nuestro estudio por la dispersión de resultados que muestran alguna de las poblaciones, fue mayor en Noruega (mediana 68, IQR 24,7) que en España (mediana 61,5; IQR 29) y se observaron diferencias significativas (M-W; U = 213574; p <0,001) (Figura 5.1).

Al analizar la especificidad dentro de los rebaños españoles de ganado bovino, se observó que la especificidad fue distinta dependiendo del

rebaño de estudio. En 7 rebaños la especificidad varió de 95-99%; sin embargo, hubo dos rebaños que presentaron especificidades bajas (82 y 65%), lo que disminuyó la especificidad general del ELISA. El rebaño 8, presentó una especificidad observada de 65,52% ( $p < 0.05$ ) y el rebaño 9 de 82,05% ( $p < 0.05$ ), mientras que en el resto de las comparaciones no se observaron diferencias estadísticamente significativas. El aumento del corte al 150% resolvió la falta de especificidad en estos dos rebaños y no se observaron diferencias significativas.

**Tabla 5.5.** Especificidad (Sp) del ELISA indirecto de P22 para cada especie en muestras de Noruega (A) y España (B) evaluadas con dos puntos de corte distintos.

**A)**

Especie	Nº de animales	Punto de corte 100%		Punto de corte 150%	
		N <sup>a</sup>	Sp <sup>b</sup>	N <sup>a</sup>	Sp <sup>b</sup>
Bovinos	500	20*	96 (93,90-97,40)	3	99,4 (98,25-99,80)
Cabras	100	22*	78 (68,93-8,00)	3*	97 (91,55-98,97)
Ovejas	100	4	96 (90,16-98,43)	0	100 (96,30-100)
Cerdos	100	0	100 (96,30-100)	0	100 (96,30-100)
Total	800				

**B)**

Especie	Nº de animales	Punto de corte 100%		Punto de corte 150%	
		N <sup>a</sup>	Sp <sup>b</sup>	N <sup>a</sup>	Sp <sup>b</sup>
Bovinos	1014	76*	92,5 (90,72-93,97)	20	98 (96,97-98,72)

Cabras	123	85 <sup>a</sup>	30,9 (23,41-39,53)	54 <sup>a</sup>	56,1 (47,27-64,55)
Ovejas	394	22	94,4 (91,71-96,29)	7	98,2 (96,39-99,14)
Cerdos	100	0	100 (86,20-100)	0	100 (86,20-100)
Total	1631				

<sup>a</sup> Número de animales positivos al ELISA.

<sup>b</sup> Intervalo de confianza del 95%.

\* Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la proporción de animales negativos para cada especie entre los animales de Noruega y España.

El ELISA P22 mostró una especificidad aceptable (98-99,4%) dependiendo del punto de corte empleado en comparación con estudios previos, donde las pruebas serológicas presentan una especificidad entre el 69,1 y el 100% dependiendo de la técnica empleada y el antígeno (Casal et al., 2014; McCallan et al., 2017; Waters et al., 2011a; Whelan et al., 2008).

En el ganado bovino se ha propuesto que la inoculación de PPDb para la IDTB dentro de los programas de erradicación puede inducir una producción de anticuerpos frente a la PPDb (Waters et al., 2015). El ELISA presentó una especificidad significativamente menor en el ganado bovino de España respecto a Noruega. La principal diferencia entre ambos países es que España no es un país OTF y el ganado está sujeto a un programa de erradicación basado en la IDTB donde a los animales se les inyectan PPDb. Por tanto, la menor especificidad en España puede ser resultado de una sensibilización producida por la PPDb (Casal et al., 2014; Waters et al., 2015). Sin embargo, también podría deberse al contacto con micobacterias ambientales (Coad et al., 2013; Waters et al., 2011a).

### 2.3. Ganado caprino

La evaluación de la sensibilidad del ELISA en el ganado caprino se realizó en una explotación de alta prevalencia de tuberculosis. Los resultados de sensibilidad se incluyen como parte de un estudio ya publicado (Bezós et al., 2018). La sensibilidad del ELISA varió entre el 85,4 y el 100% dependiendo del punto de corte utilizado y del momento de obtención del suero (antes o 15 días después de la IDTB).

La especificidad en las cabras noruegas fue del 97% cuando se utilizó el punto de corte de 150%, mientras que en cabras españolas fue del 70,59% con el mismo punto de corte. En cuanto a la mediana, en España (Me 105,3; IQR 100,6) fue más alta que en Noruega (Me 84,5; IQR 36,6), observándose además una mayor dispersión (M-W;  $U = 2666$ ;  $p = 0,018$ ). No se observaron diferencias significativas entre los dos rebaños de cabras en España, sin embargo, en las muestras noruegas, empleando un punto de corte de 100%, la especificidad fue significativamente menor ( $p = 0,002$ ) en aquellos animales vacunados de paratuberculosis (especificidad del 58,33%) respecto al grupo no vacunado (especificidad del 90,62%). Cuando se utilizó un punto de corte alternativo de 150%, no se observaron diferencias significativas entre los grupos ( $p = 0,294$ ).

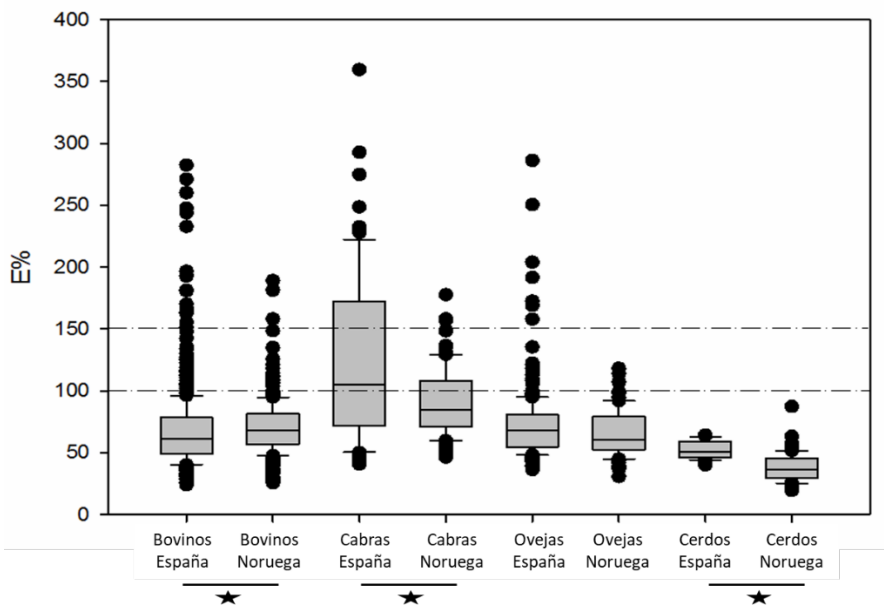
En cabras, nuestro ELISA mostró una especificidad muy pobre, incluso en rebaños no vacunados (90,62%). Las pruebas serológicas existentes para las cabras presentan valores de especificidad entre 88-100% (Gutierrez et al., 1998; Marassi et al., 2009; O'Brien et al., 2017).

Al igual que nuestros resultados, se han registrado interferencias diagnósticas producidas por *M. avium* subsp. *paratuberculosis* en cabras (Kassa et al., 2012; Tschopp et al., 2011). Nuestros resultados corroboran que la vacunación frente a PTB tiene un gran impacto en la especificidad del ELISA ya que se observó una especificidad significativamente menor en cabras vacunadas (Coad et al., 2013).

## 2.4. Ganado ovino

La evaluación de la sensibilidad del ELISA P22 en ovejas la llevó a cabo la Dra. Ana Balseiro Morales que obtuvo una sensibilidad del 100% (Balseiro, A. Comunicación personal).

En cuanto a la especificidad en ovejas, estuvo entre 94,43% y 100% dependiendo del punto de corte y del país. El E% en ovejas fue menor que en bovinos y caprinos tanto en España (Me = 67,6; IQR 26) como en Noruega (Me 60,3; IQR 26,8) y no se observaron diferencias significativas (M-W;  $U = 17479$ ;  $p = 0,081$ ). No fue posible determinar si había diferencias significativas entre los rebaños en las muestras de Noruega ya que las muestras se seleccionaron al azar de muchos rebaños y se seleccionaron pocas muestras de cada uno.



**Figura 5.1.** E% del ELISA indirecto de las distintas especies de las muestras procedentes de Noruega y España. Las casillas representan el cuartil inferior y superior, así como la mediana y los valores atípicos ("outliers") están representados por círculos cerrados. Las líneas discontinuas representan los dos puntos de corte de 100% y 150%. \* Diferencias significativas entre los grupos.

En ovejas existe muy poca información disponible en la bibliografía puesto que no se consideraba una especie relevante en la epidemiología de la tuberculosis hasta hace poco (Munoz-Mendoza et al., 2016). Solo se ha descrito un test serológico basado en la PPD<sub>b</sub> que presentaba una sensibilidad entre 93,5 y 100% y una especificidad entre 37,5 y 50%. La falta de sensibilidad la atribuyen a una infección por *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. En este sentido el ELISA P22 presenta una sensibilidad similar mientras que la especificidad es considerablemente mayor.

Algunos estudios han sugerido que la infección por *C. pseudotuberculosis* puede interferir en el diagnóstico de tuberculosis ya que comparten antígeno con micobacterias incluidas en MTBC (Sharpe et al., 2010). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las ovejas de Noruega y España, a pesar de que se aisló *C. pseudotuberculosis* en el rebaño de ovejas en España. Por lo tanto, la infección por *C. pseudotuberculosis* no siempre interfiere en el diagnóstico serológico de la tuberculosis en ovejas (Bezós et al., 2015).

### 2.5. Ganado porcino

La evaluación de la sensibilidad del ELISA P22 en cerdos infectados de tuberculosis se llevó a cabo en el IREC por Thomas Jobin mostrando una sensibilidad del 78,1% (Thomas, J. Comunicación personal). La evaluación de la especificidad se obtuvo del estudio de cerdos libres de tuberculosis.

No hubo ningún animal positivo ni en las muestras de Noruega ni en las de España. Aunque todos los cerdos fueron negativos y la especificidad fue 100% en muestras de ambos países, la mediana fue más alta en España (Me = 50,9; RIC 13) que en Noruega (Me 36,3; RIC 15,70) y estas diferencias fueron estadísticamente significativas (MW; U = 273; p <0,001).

Los test de detección de anticuerpos en cerdos tienen, en términos generales, un buen rendimiento. El ELISA P22 muestra valores de especificidad y sensibilidad similares a los descritos previamente (Cardoso-Toset et al., 2017). Además, se sabe que las pruebas serológicas en suidos son más precisas que en otras especies (Boadella et al., 2011b; Cardoso-Toset et al., 2015).

## 2.6. Alpacas y llamas

La especificidad del ELISA en llamas y alpacas se muestra en la Tabla 5.4. Los 392 animales libres de tuberculosis analizados en este estudio fueron negativos al ELISA indirecto, mostrando una sensibilidad del 100% (99,03-100 CI 95%) en estas especies.

Las pruebas serológicas descritas anteriormente presentan un rango de especificidad que varía entre del 84 a 98% (Bezoz et al., 2014b; Lyashchenko et al., 2011; Rhodes et al., 2012). El ELISA P22 logró una especificidad excelente del 100%, más alta que todas las pruebas serológicas descritas hasta la fecha para el diagnóstico de tuberculosis en camélidos. Además, no se observó ningún efecto anamnésico a los 5 días como consecuencia de la inyección de PPD<sub>b</sub>. El número de animales incluidos en este estudio fue lo suficientemente grande como para tener datos de especificidad fiables, incluso con muestras 5 días después de la inyección de PPD<sub>b</sub>.

**Tabla 5.6.** Especificidad e intervalo de confianza de Wilson del 95% del ELISA utilizando muestras de suero de llamas y alpacas obtenidas antes y después de la IDTB. <sup>a</sup> Número de animales positivos; <sup>b</sup> Intervalo de confianza del 95% para la especificidad

País	Especie	Nº de animales	Pre-IDTB		Post-IDTB	
			N <sup>a</sup>	Sp <sup>b</sup>	N <sup>a</sup>	Sp <sup>b</sup>
Perú	Alpaca	120	0	100 (96,90-100)	0	100 (96,90-100)
Perú	Llama	40	0	100 (91,24-100)	0	100 (91,24-100)
Reino Unido	Alpaca	236	0	100 (98,37- 100)	-	-
Total		396	0	100 (99,03-100)	0	100 (97,66-100)



La sensibilidad del ELISA indirecto fue del 63% (35/56) antes de la inoculación de la PPDb y del 96,4% (54/56) 15 días después de la inyección de PPDb (Tabla 5.5).

La sensibilidad del ELISA P22 resultó ser moderada, similar a la descrita por otros ensayos serológicos en SAC, que oscilan entre el 43 y el 74% (Bezós et al., 2013; Lyashchenko et al., 2011; Rhodes et al., 2012). Con muestras obtenidas 15 días después de la IDTB, la sensibilidad del ELISA P22 aumentó al 96%, resultado más alto que el descrito en todos los ensayos serológicos previos que utilizaron muestras 15 días después de la prueba cutánea, cuya sensibilidad estuvo entre 77 y 89% (Bezós et al., 2013). Los resultados obtenidos con muestras 15 días después de la inyección de PPD sugieren que el ELISA P22 podría ser una herramienta de diagnóstico de tuberculosis útil en SAC.

**Tabla 5.7.** Sensibilidad e intervalo de confianza del 95% para el ELISA indirecto en llamas y alpacas infectadas de tuberculosis (en base al estudio post-mortem, cultivo positivo y/o presencia de lesiones visibles en la necropsia).

Nº de animales	Pre-IDTB	15 después de IDTB
56	62,50 (49,41-73,99)	96,43 (87,88-99,02)

*Capacidad de detección de anticuerpos en una infección natural por M. bovis y M. microti: estudio de brotes en Inglaterra*

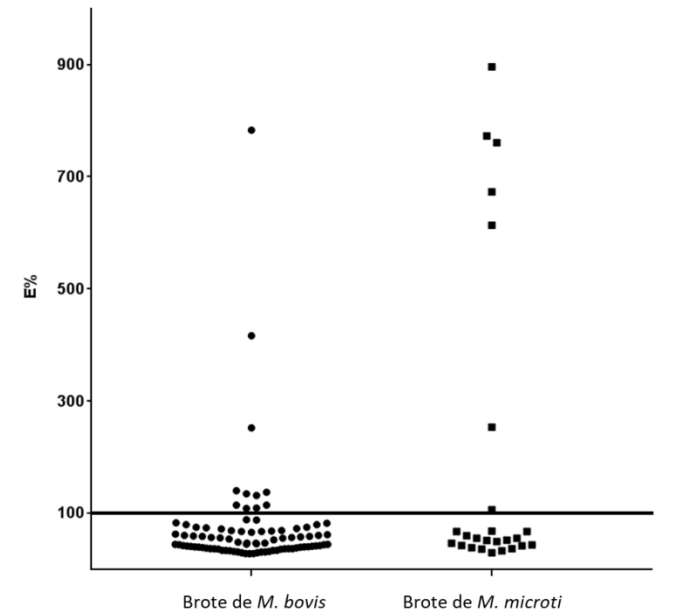
- **Brote de *M. bovis*:**

De los 88 animales analizados en el rebaño A, 11 fueron positivos al ELISA indirecto. De estos 11 animales positivos, 3 de ellos tenían un E% por encima de 150% y el resto de los animales tenían valores más cercanos al punto de corte, entre 100 y 150%.

- **Brote de *M. microti***

En el rebaño B, de las 25 muestras analizadas, 7 fueron positivos al ELISA y solo un animal mostró un E% cercano al punto de corte. El resto presentaban E%

muy elevados lo que es un indicativo de la gran capacidad del ELISA para detectar animales infectados por *M. microti*.



**Figura 5.2.** Histograma del valor de E% de cada animal mediante ELISA indirecto utilizando P22 como antígeno en brotes de *M. bovis* y *M. microti*. La línea horizontal representa el punto de corte elegido.

La tuberculosis en los SAC está causada principalmente por *M. bovis* y *M. microti*, y se ha descrito en varios países europeos, incluido España, los Países Bajos, Suiza, Irlanda y el Reino Unido (Alvarez et al., 2012; Ryan et al., 2008; Twomey et al., 2012; Zanolari et al., 2009). El ELISA P22 en estas especies ha demostrado la capacidad para detectar anticuerpos en una infección tuberculosa debido a *M. bovis* y también a *M. microti*.

Dado que las llamas y alpacas se han convertido en un animal importante en Europa y se necesitan más herramientas para el diagnóstico de tuberculosis en estas especies, nuestros resultados sugieren que el ELISA indirecto de P22 descrito puede proporcionar una técnica más sensible y

específica que otras pruebas de detección de anticuerpos de tuberculosis utilizadas en alpacas para detectar infección por *M. bovis* y *M. microti*.

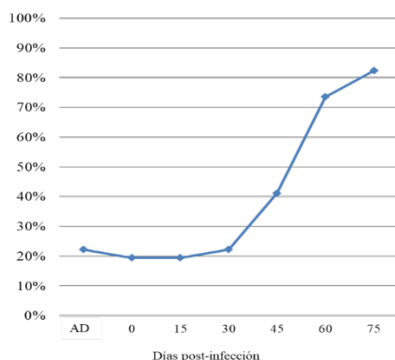
### 2.7. Ciervos y jabalíes

El ELISA indirecto para diagnóstico, que emplea como antígeno de tapizado P22, se puso a punto tanto para ciervos y como para jabalíes en el IREC. El inmunoensayo mostró una sensibilidad del 70,1% y de una especificidad del 99% en ciervos, y para jabalíes fue del 84,1 y 98,4% respectivamente. Estos resultados constituyen parte de la tesis doctoral de Jobin Thomas y se encuentran en revisión (Thomas, J. En revisión).

### 2.8. Tejones

*Tejones infectados experimentalmente de Reino Unido.*

La proporción de animales positivos al ELISA, así como el título de anticuerpos, aumentan a medida que avanza la infección, como se observa en la Figura 5.3. Antes de la infección experimental (pre-desafío y T0), siete de los 36 tejones (19,44%) fueron positivos al ELISA indirecto con el punto de corte de  $E\%=100\%$ , mostrando una especificidad del 80,56% que aumentó al 83,34% con el incremento del punto de corte a  $E\%=150\%$ . Dado que los animales se confirmaron como libres de tuberculosis en el momento de la prueba, la positividad se atribuyó a una reactividad cruzada con otros antígenos presentes en la P22.



**Figura 5.3.** Proporción (%) de animales positivos mediante ELISA indirecto a distintos tiempos post-infección. AD= antes del desafío.

Con un punto de corte de 100% el ELISA indirecto mostró una sensibilidad del 82% para detectar animales infectados (Tabla 5.8). Cuando empleábamos un punto de corte de 150% la sensibilidad disminuye a un 64%. A medida que avanzaba la infección la mediana del E% se incrementó del 61,87% antes de la infección a 210,32% al día 75 post-infección, observándose diferencias significativas (Kruskal-Wallis test, d.f. = 6,  $p < 0.001$ ). El mayor incremento en la proporción de animales positivos se produjo aproximadamente al mes y medio post-infección, cuando se esperaba que aumentaran los niveles de anticuerpos. El porcentaje de animales que resultaron positivos al ELISA de los días 0 a 30 dpi difiere significativamente del porcentaje de animales positivos entre los días 45 y 75 dpi (Wilcoxon signed-rank test,  $p < 0.001$ ), lo que sugiere que la seroconversión se produce a los 45 dpi (Figura 5.3).

**Tabla 5.8.** Sensibilidad y especificidad del ELISA indirecto en tejones. Los intervalos entre paréntesis indican el intervalo de confianza.

		Nº de animales	E%=100%	E%= 150%
Infectados de Tuberculosis (Sensibilidad)	Reino Unido	34	82 (66-92)	64,71 (48-79)
	Irlanda <sup>a</sup>	25	80 (61-91)	72 (52-86)
Libres de tuberculosis (Especificidad)	Reino Unido	36	80,56 (65-90)	80,56 (65-90)
	Irlanda <sup>b</sup>	28	75 (57-87)	85,71 (83-99)
	España	32	96,87 (84-99)	100 (89-100)

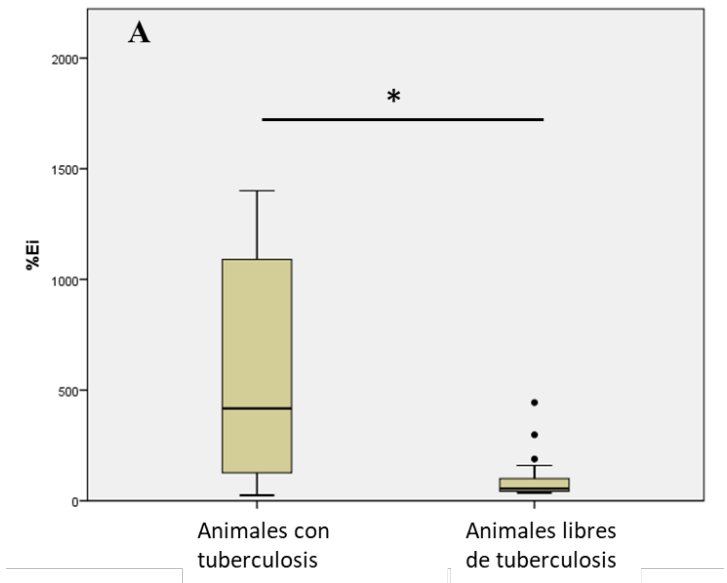
<sup>a</sup> Basado en el cultivo microbiológico de *M. bovis*.

<sup>b</sup> Sin lesiones visibles y cultivo negativo para *M. bovis*.

*Tejones infectados naturalmente y no infectados de Irlanda.*

De los 25 tejones infectados naturalmente, con el punto de corte de 100%, 20 fueron positivos al ELISA indirecto dando una sensibilidad del 80%. Aquellos animales con lesiones visibles presentaban los valores de densidad óptica más elevados.

La Figura 5.4 muestra los valores medios de E% en el grupo de animales infectados y no infectados de tuberculosis, mostrando diferencias significativas entre ellos (Mann-Whitney,  $p < 0,001$ ).



**Figura 5.4:** E% del ELISA indirecto para las muestras de tejones infectados de tuberculosis y libres de tuberculosis procedentes de Irlanda. Las casillas indican el cuartil superior e inferior, así como la media. Los valores atípicos ("outlayers") están representados por círculos cerrados. \*Diferencias significativas.

*Tejones no infectados procedentes de España:*

De los 32 tejones libres de tuberculosis procedentes de España, solo uno fue positivo en el ELISA indirecto, lo que supone una especificidad del 96,88%.

Para esta especie, nuestros resultados sugieren que el ELISA indirecto pueden proporcionar una mayor sensibilidad que otras pruebas de detección de anticuerpos para el diagnóstico de tuberculosis en tejonos de los que existen actualmente. Estas pruebas, que resultan económicas, sencillas y requieren pequeños volúmenes de suero, ayudaría a mejorar la vigilancia de la tuberculosis y los estudios de campo en tejonos.

En tejonos infectados experimentalmente, la sensibilidad osciló entre el 73,52% a los 60 días post-infección hasta 82,35% a 75 dpi. En las muestras de tejonos de Irlanda, el ELISA indirecto mostró una sensibilidad del 80%, acorde a lo obtenido en animales infectados experimentalmente. Estos resultados son considerablemente más altos que las sensibilidades del 25,3-55% descritas para otras pruebas serológicas (Aznar et al., 2014; Chambers et al., 2010; Clifton-Hadley et al., 1995; Greenwald et al., 2003). Con respecto a la especificidad, varía en función de la población de tejonos/país de origen de las muestras, probablemente debido a una sensibilización con diferentes especies de micobacterias ambientales (Balseiro et al., 2011). Aunque la especificidad fue muy buena (del 96%) en los tejonos procedentes de España, la especificidad fue menor en las poblaciones de tejonos de Reino Unido y de la República de Irlanda.

La menor especificidad observada en tejonos de Reino Unido y la República de Irlanda sugiere que estas poblaciones de tejonos pueden haber estado expuestos previamente a antígenos de reacción cruzada homólogos a P22. Aunque P22 está compuesto principalmente por MPB70 y MPB83, comparte varias proteínas con el complejo *M. avium* que pueden contribuir a la reactividad cruzada. Además, otras micobacterias no tuberculosas que no forman parte del MAC, presentan proteínas con una alta homología con la secuencia de MPB70 y MPB83 de *M. bovis*, como las proteínas de *M. kansasii* (77% de identidad, 98% de cobertura) y *M. abscessus* (73 % de identidad, 82% de cobertura) ([www.uniprot.es](http://www.uniprot.es), consultado en julio de 2018).

Es posible que se haya subestimado la especificidad en poblaciones silvestres de la República de Irlanda, donde algunos de los animales sin lesiones compatibles con tuberculosis y negativo al cultivo de micobacterias mostraron valores de E% superior a 400, probablemente debido a la baja

sensibilidad del cultivo, incluso cuando se realiza en tejidos que presentan lesiones (Crawshaw et al., 2008).

### 3. Resumen

Aunque la IDTB es la prueba oficial de diagnóstico de tuberculosis, las técnicas serológicas de diagnóstico tienen la ventaja de ser muy rápidas, fáciles de realizar y la posibilidad para analizar una gran cantidad de muestras en muy poco tiempo. No obstante, los ELISAS disponibles presentan una sensibilidad y especificidad de baja a moderada. Por ello, la evaluación de nuevos reactivos para la detección de anticuerpos específicos frente al complejo *M. tuberculosis* podría aportar mejoras en el diagnóstico de la tuberculosis. En este estudio hemos descrito el desarrollo y la validación de un ELISA indirecto basado en el complejo proteico P22 para utilizar en el diagnóstico de tuberculosis en distintas especies domésticas y salvajes.

La sensibilidad del ELISA P22, comparable a los publicados para la IDTB, osciló entre el 63 y el 100% dependiendo de la especie y, estatus y procedencia de los animales. Importante también es el hecho de que el suero se obtuviera antes de que los animales fueran sometidos a la prueba de la IDTB o 15 días después de la IDTB, siendo mayor la sensibilidad en este último caso. La especificidad del ELISA en ganado bovino, cabras, ovejas y cerdos se evaluó en muestras procedentes de diferentes especies pertenecientes a un país libre de tuberculosis (Noruega) y a una región libre de tuberculosis, pero de un país en el que la enfermedad es endémica y por tanto sujeta a campaña de erradicación (España). En las muestras procedentes de Noruega, la especificidad del ELISA fue de buena a excelente en bovinos, ovinos y porcinos. Sin embargo, en la región española libre de tuberculosis, la proporción de falsos positivos al ELISA en el ganado vacuno fue mayor, atribuido a las inoculaciones de PPDb dentro de las campañas de saneamiento. Por otra parte, la especificidad en cabras fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ), en animales vacunados de paratuberculosis que en rebaños no vacunados. No se observaron diferencias significativas en el rebaño de ovejas infectadas con *C. pseudotuberculosis*.

La especificidad en cerdos fue del 100% independientemente del país. En llamas y alpacas la especificidad se evaluó en distintas explotaciones de España, Perú e Inglaterra libres de tuberculosis (n=396) obteniendo una especificidad del 100%. Además, se evaluó la capacidad del ELISA para detectar anticuerpos específicos en dos rebaños en los que se diagnosticó una infección por *M. bovis* (n=88) y *M. microti* (n=25). Respecto a los tejones, en tejones infectados experimentalmente, los niveles de anticuerpos frente a P22 se detectaron a los 45 días después de la infección. El ELISA, indirecto mostró una sensibilidad de 74-82% en tejones experimental y naturalmente infectados con una especificidad que varían entre el 75 y el 96% dependiendo de la población de tejones evaluados.

Debido a su excelente especificidad en cerdos y camélidos y aceptable en ganado bovino, ovejas y tejones, el ELISA puede constituir una buena opción para la detección de tuberculosis a nivel de rebaño. Además, la serología podría usarse como técnica de vigilancia para detectar anticuerpos específicos frente al MTBC en países OTF debido a su alta especificidad y sus ventajas (es decir, simplicidad, bajo costo y requisitos de recursos mínimos).





## 4. Discusión general



## 4. DISCUSIÓN GENERAL

La tuberculosis constituye un problema de salud de orden mundial y está presente en la práctica totalidad de los países del planeta. Ocasiona un gran número de muertes y un elevado coste económico tanto por el tratamiento en el ser humano, como por las campañas de erradicación de la tuberculosis animal y las pérdidas productivas de los animales infectados (Enfermedades de la Lista de la OIE, 2017). El diagnóstico precoz y certero es fundamental para su erradicación, sin embargo, en el momento actual los reactivos disponibles presentan ciertas limitaciones. La caracterización y estandarización de reactivos, así como la identificación de los agentes causales de la reactividad cruzada que interfieren en el diagnóstico son de suma importancia.

### Caracterización inmunoproteómica de PPDb

El papel de la respuesta humoral en la tuberculosis es un tema muy controvertido (Achkar et al., 2015). Existen muchos estudios que resaltan la importancia de los anticuerpos tanto en la defensa del organismo frente a la bacteria como en el diagnóstico, ya sea en animales domésticos y salvajes como en humanos (Casal et al., 2014; Gortazar et al., 2011; Li and Javid, 2018; Zimmermann et al., 2016). Aunque la respuesta inmune humoral en la protección frente a una infección por bacterias del MTBC está menos caracterizada que la respuesta celular mediada por células T, existen evidencias de que las células B modulan la respuesta de las células T frente a las micobacterias (Jacobs et al., 2016) al estar estrechamente relacionadas la respuesta inmune humoral y celular (Claman et al., 1966).

A pesar de que la tuberculina fue desarrollada en 1890 y utilizada con fines diagnósticos ya ese mismo año, todavía no se conoce perfectamente su composición al ser un producto complejo y difícil de estandarizar, y no ha podido ser sustituida por productos proteicos más sencillos. Nuestros resultados demuestran que un 20% de las proteínas están formando agregados de alto peso molecular y originados en el proceso de obtención de la propia PPDb. Resultados similares se obtuvieron para la PPD humana (Ho

## Discusión general

et al., 2006). La PPDb y la PPD humana se obtienen a partir de un cultivo de *M. bovis* y *M. tuberculosis*, respectivamente, mediante un proceso de inactivación por calor, filtración, precipitación de proteínas y posterior resuspensión. En estas circunstancias es perfectamente conocido que estos tratamientos extremos sobre compuestos de naturaleza proteica favorece que las proteínas, al perder sus características estructurales nativas tiendan a la agregación (Manning et al., 2010).

Por otra parte, existe un gran consenso en la literatura científica de que las proteínas agregadas logran aumentar una respuesta inmune específica, aunque los mecanismos inmunológicos y bioquímicos precisos responsables de este incremento de la inmunogenicidad no están bien definidos (Rosenberg, 2006; Sauerborn et al., 2010). Se sabe que los agregados proteicos poseen una mayor capacidad de activar las APC (Células Presentadoras de Antígenos, *Antigen-Presenting Cells*) y que la agregación incrementa el procesamiento de las proteínas por estas células, potenciándose de esta forma la respuesta inmunológica (Ratanji et al., 2014).

La estructura de un antígeno agregado es distinta a la de la proteína monomérica y se ha especulado que los epitopos repetitivos formados por agregación pueden ser capaces de activar las células B directamente ya que pueden entrelazar BcR (*B-cell receptor* o receptor de linfocitos B), estimulando una cascada de señales que diferencia los linfocitos B a células plasmáticas (Bachmann and Zinkernagel, 1997). Nuestros resultados refuerzan estas hipótesis, ya que la respuesta inmune en ratones es considerablemente mayor cuando se inmunizan con la PPDb completa que cuando inmunizábamos con la PPDb de la que habíamos retirado el complejo de alto peso molecular (PPDb-F), situación en la que disminuyó tanto el título de anticuerpos específicos en el suero policlonal como el número de hibridomas obtenidos.

Cuando analizamos la naturaleza del complejo P22, comprobamos que mayoritariamente está formado por MPB70, MPB83, CFP-10, ESAT-6, GroEL, MPB63 o *alpha-crystallin* (Infantes-Lorenzo et al., 2017). Además de las proteínas en el complejo P22, en la PPDb existen otras que son más abundantes y teóricamente más antigénicas que MPB70 y MPB83 y que

también deberían inducir la producción de anticuerpos frente a ellas, como sería MPB63, una proteína hipotética (código de acceso del NCBI 489505073) o 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase. Sin embargo, cuando inmunizamos a animales con PPD<sub>b</sub> siempre observamos una respuesta casi exclusiva frente a las proteínas del complejo (MPB70 y MPB8383).

### Respuesta humoral en animales infectados por MTBC

Aunque el papel de la inmunidad humoral en la tuberculosis es ampliamente debatido, actualmente en un número creciente de estudios se propone a las células B y a los anticuerpos como componentes importantes de la respuesta inmune frente al MTBC (Li and Javid, 2018)

Kunnath-Velayudhan (2010) estudiaron mediante microarrays de proteínas el proteoma de *M. tuberculosis*. Observaron que, de las más de 4000 proteínas analizadas, solo una décima parte indujo anticuerpos en al menos un individuo, y solo 13 proteínas eran responsables mayoritariamente de la respuesta inmune humoral, especialmente en casos de enfermedad avanzada. Además, estas 13 proteínas han sido identificadas como componentes de las PPDs, entre ellas MPT83, homóloga en *M. tuberculosis* de MPB83. Estos resultados ponen de manifiesto que la respuesta inmune humoral va dirigida frente a un número pequeño de proteínas y que han sido clasificadas como proteínas secretoras. Nuestros resultados corroboran estos hallazgos ya que tanto en ratones hiperinmunizados con PPD<sub>b</sub> como animales infectados de forma natural o experimental por MTBC, presentan una respuesta inmune humoral fundamentalmente dirigida a MPB70 y MPB83, especialmente en estados avanzados de enfermedad cuando la carga bacteriana es mayor y la bacteria metabólicamente más activa. Debemos indicar también, que de 11 proteínas que hemos identificado mediante AcM 9 son proteínas secretoras o de membrana.

Por otra parte, posiblemente, la inducción de una mayor respuesta inmune humoral, no se deba exclusivamente al hecho de que las proteínas MPB70/83 estén formando parte del complejo de agregados, sino que además pueden estar contribuyendo otros fenómenos. Así, por ejemplo, está

## Discusión general

muy descrito el caso de *Cryptococcus neoformans*, donde el efecto protector mediado por anticuerpos depende de la inmunidad celular (Yuan et al., 1997). Este estudio demuestra que las células T y el IFN- $\gamma$  son necesarios para la protección mediada por anticuerpos. Un hecho similar puede ocurrir en tuberculosis con las proteínas MPB70 y MPB83 como principales responsables de la inmunidad humoral. Uno de los primeros eventos en el desarrollo de anticuerpos es la activación específica de las células T colaboradoras CD4<sup>+</sup> (Parker, 1993). Las proteínas MPB70/83 presentan en su estructura epítomos B y T (Tollefsen et al., 2003), lo que le permite la activación de los linfocitos B mediante el reconocimiento del antígeno soluble y a su vez estimular una respuesta T colaboradora iniciada por las células presentadoras de antígenos tras el procesamiento de estas proteínas y su presentación a las células T en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II. Así, simultáneamente tendría lugar una activación de la respuesta B y T. Queda pues justificado un cambio de estrategia en el diagnóstico ya que la combinación de la detección de una respuesta inmune humoral y celular podría suponer un incremento de la detección del número de animales infectados (Bezoz et al., 2018; Casal et al., 2017; Waters et al., 2017).

Para la erradicación de una enfermedad infecciosa como la tuberculosis, es necesario llevar a cabo un **diagnóstico** precoz y certero además de contar con **medidas profilácticas** eficaces. El trabajo que presentamos plantea aportaciones, en aspectos concretos tanto del diagnóstico como de la prevención.

Hemos obtenido un producto, P22, con resultados diagnósticos de al menos igual sensibilidad y especificidad que los habitualmente utilizados en la detección de anticuerpos específicos a la vez que proponemos el diagnóstico serológico como la alternativa para la detección de animales infectados por MTBC en circunstancias epidemiológicas concretas.

Los avances producidos en las últimas décadas han puesto de manifiesto que la adecuada y eficaz respuesta por parte del sistema inmunitario para mantener la homeostasis del organismo pasa por una interdependencia del sistema inmunológico innato y el adaptativo y en este último, la respuesta mediada por anticuerpos y la respuesta celular están

estrechamente relacionadas. En enfermedades como la leishmaniosis, el SIDA o la tuberculosis, donde el diseño tradicional de vacunas ha fracasado, será necesario continuar los planteamientos donde estén implicados tanto el sistema inmune innato como el adaptativo en sus dos ramas, la humoral y la celular. En este sentido nuestro trabajo puede contribuir a esclarecer alguno de los aspectos de la respuesta inmunológica y más concretamente sobre la respuesta inmune humoral en la tuberculosis.





## 5. Conclusiones



## 5. CONCLUSIONES

### PRIMERA

La inoculación de ratones con tuberculina bovina induce una respuesta serológica mayoritaria frente a las proteínas MPB70 y MPB83 de *M. bovis*, obteniéndose, con el procedimiento utilizado, AcM exclusivamente frente a ellas.

### SEGUNDA

En la tuberculina bovina, las proteínas MPB70 y MPB83 están formando parte de un complejo multiproteico de alto peso molecular al que hemos denominado P22.

### TERCERA

El Anticuerpo monoclonal SIM 377-18 permite la inmunopurificación del complejo P22 en el que además de las mayoritarias MPB70 y MPB83 están incluidas otras 116 proteínas de las 456 identificadas en la PPDb.

### CUARTA

Nuestros resultados indican que las fuerzas intermoleculares en el complejo P22 no son de naturaleza proteína-proteína, proteína-DNA, ni proteína-RNA. Todo parece indicar que son de naturaleza lipoproteica.

### QUINTA

El Anticuerpo Monoclonal SIM 377-18 que reconoce tanto la proteína MPB70 como la MPB83, ha demostrado tener un gran potencial para ser utilizado en estudios inmunohistoquímicos de tuberculosis.

### SEXTA

Se han producido un grupo de anticuerpos monoclonales (SIM 406-11, 406-22, 406-46, 412-6, 416-23 y 416-27) que reconocen epítomos comunes en las proteínas meromycolate acyl carrier protein, serine protease, ModD protein, diacylglycerol acyltransferase, GroEl y enolasa, presentes en *M. bovis*, *M. avium* subsp. *avium* y *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

## Conclusiones

### SÉPTIMA

Nuestros resultados indican que las proteínas GroES y DNaK, meromycolate acyl carrier protein, secretion protein y 50S ribosomal protein L7/L12 son las mayoritariamente responsables de la relatividad cruzada entre la PPD<sub>b</sub> y PPD<sub>a</sub>.

### OCTAVA

El ELISA basado en la utilización de P22 como antígeno, presenta una sensibilidad por encima del 60% en vacas, cabras, ovejas, llamas y alpacas en rebaños infectados españoles, comparable a la sensibilidad de la técnica de intradermorreacción.

### NOVENA

El ELISA con P22 mostró una especificidad por encima del 95% en artiodáctilos domésticos (bovinos, ovinos y porcinos) en un país libre de tuberculosis (Noruega).

### DÉCIMA

Los estudios serológicos comparados realizados con P22 en bovinos y caprinos procedentes de Noruega y España ponen de manifiesto que la disminución de la especificidad podría atribuirse en buena medida a las pruebas de intradermorreacción con PPD<sub>b</sub>.

### UNDÉCIMA

El ELISA desarrollado con el complejo P22 se valúa como una herramienta muy útil para el diagnóstico serológico multiespecie de tuberculosis, especialmente en aquellos países y animales que no estén sujetos a la prueba de intradermorreacción.

## 6. Conclusions



## 6. CONCLUSIONS

### FIRST

The inoculation of mice with bovine tuberculin induces a serological response mainly against MPB70 and MPB83 proteins of *M. bovis*. The monoclonal antibodies (mAbs) obtained with this procedure react exclusively against these proteins.

### SECOND

In bovine tuberculin, the MPB70 and MPB83 proteins are included in a high molecular weight multiprotein complex that we have named P22.

### THIRD

The mAb SIM 377-18 allows the immune purification of the P22 complex. The P22 complex includes the major proteins MPB70 and MPB83, as well as 116 proteins of the 456 identified in the PPDb.

### FOURTH

Our results indicate that the intermolecular forces in the P22 complex are not of a protein-protein nature nor of a protein-DNA or a RNA-protein nature, but seem to be of a lipoproteic nature.

### FIFTH

The SIM 377-18 mAb, recognizes both MPB70 and MPB83 proteins and has shown great potential in tuberculosis immunohistochemistry studies.

### SIXTH

We have produced a group of mAbs (SIM 406-11, 406-22, 406-46, 412-6, 416-23 and 416-27) that recognize common epitopes of the meromycolate acyl carrier protein, serine protease protein, ModD protein, diacylglycerol acyltransferase, GroEl and enolase. All of these proteins are present in *M. bovis*, *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.



## *Conclusions*

### **SEVENTH**

Our results indicate that the proteins GroES and DNaK, meromycolate acyl carrier protein, secretion protein and 50S ribosomal protein L7 / L12, are mostly responsible for the cross reactivity between PPD<sub>b</sub> and PPD<sub>a</sub>.

### **EIGHTH**

The use of an ELISA based in antigen P22 in Spanish tuberculosis infected cattle, goats, sheep, llamas and alpaca herds, presents a sensitivity over 60%, similar to the intradermal tuberculin test.

### **NINTH**

The use of the P22-antigen based ELISA in artiodactyls (cattle, sheep and pigs) in a tuberculosis-free country (Norway) has shown a specificity over 95%.

### **TENTH**

Compared serological anti-P22 studies in cattle and goats from Norway and Spain show that the decrease in specificity could be mainly attributed to intradermal reaction tests with PPD<sub>b</sub>.

### **ELEVENTH**

The ELISA developed with P22 complex, has shown to be a very useful tool for multispecies serological diagnosis of tuberculosis, especially in those countries and animals which are not subjected to the intradermal reaction test.

## 7. Bibliografía



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard, C., Govaerts, M., Meikle, V., Gutierrez-Pabello, J.A., McNair, J., Andersen, P., Suarez-Guemes, F., Pollock, J., Espitia, C., Cataldi, A., 2010. Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity. *Prev Vet Med* 96, 161-169.
- Abalos, P., Retamal, P., 2004. [Tuberculosis: a re-emerging zoonosis?]. *Rev Sci Tech* 23, 583-594.
- Abdalla, A., 1998. Tuberculosis bovina. *Sancor*, 56, 26-30.
- Achkar, J.M., Chan, J., Casadevall, A., 2015. B cells and antibodies in the defense against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Rev* 264, 167-181.
- Aebersold, R., 2003. A mass spectrometric journey into protein and proteome research. *J Am Soc Mass Spectrom* 14, 685-695.
- Aebersold, R., Mann, M., 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198-207.
- Alexander, K.A., Laver, P.N., Michel, A.L., Williams, M., van Helden, P.D., Warren, R.M., Gey van Pittius, N.C., 2010. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis* 16, 1296-1299.
- Alvarez, J., Bezos, J., de la Cruz, M.L., Casal, C., Romero, B., Dominguez, L., de Juan, L., Perez, A., 2014. Bovine tuberculosis: within-herd transmission models to support and direct the decision-making process. *Res Vet Sci* 97 Suppl, S61-68.
- Alvarez, J., Bezos, J., Juan, L., Vordermeier, M., Rodriguez, S., Fernandez-de-Mera, I.G., Mateos, A., Dominguez, L., 2012. Diagnosis of tuberculosis in camelids: old problems, current solutions and future challenges. *Transbound Emerg Dis* 59, 1-10.
- Alvarez, J., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Saez, J.L., Marques, S., Dominguez, C., Minguez, O., Fernandez-Mardomingo, B., Mateos, A., Dominguez,

## Bibliografía

- L., Aranaz, A., 2009. Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay. *Vet Microbiol* 135, 389-393.
- Andersen, P., Kaufmann, S.H., 2014. Novel vaccination strategies against tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4.
- Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., Dominguez, L., 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 1785-1789.
- Aurtenetxe, O., Barral, M., Vicente, J., de la Fuente, J., Gortazar, C., Juste, R.A., 2008. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against *Mycobacterium bovis* in European wild boar. *BMC Vet Res* 4, 43.
- Aznar, I., Frankena, K., More, S.J., Whelan, C., Martin, W., Gormley, E., Corner, L.A., Murphy, D., De Jong, M.C., 2014. Optimising and evaluating the characteristics of a multiple antigen ELISA for detection of *Mycobacterium bovis* infection in a badger vaccine field trial. *PLoS One* 9, e100139.
- Bachmann, M.F., Zinkernagel, R.M., 1997. Neutralizing antiviral B cell responses. *Annu Rev Immunol* 15, 235-270.
- Bailey, S.S., Crawshaw, T.R., Smith, N.H., Palgrave, C.J., 2013. *Mycobacterium bovis* infection in domestic pigs in Great Britain. *Vet J* 198, 391-397.
- Baldwin, C.L., Telfer, J.C., 2015. The bovine model for elucidating the role of gammadelta T cells in controlling infectious diseases of importance to cattle and humans. *Mol Immunol* 66, 35-47.
- Balseiro, A., Gonzalez-Quiros, P., Rodriguez, O., Francisca Copano, M., Merediz, I., de Juan, L., Chambers, M.A., Delahay, R.J., Marreros, N., Royo, L.J., Bezos, J., Prieto, J.M., Gortazar, C., 2013. Spatial relationships between Eurasian badgers (*Meles meles*) and cattle infected with *Mycobacterium bovis* in Northern Spain. *Vet J* 197, 739-745.

- Balseiro, A., Rodriguez, O., Gonzalez-Quiros, P., Merediz, I., Sevilla, I.A., Dave, D., Dalley, D.J., Lesellier, S., Chambers, M.A., Bezos, J., Munoz, M., Delahay, R.J., Gortazar, C., Prieto, J.M., 2011. Infection of Eurasian badgers (*Meles meles*) with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* complex in Spain. *Vet J* 190, e21-25.
- Bang, D., Herlin, T., Stegger, M., Andersen, A.B., Torkko, P., Tortoli, E., Thomsen, V.O., 2008. *Mycobacterium arosiense* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species causing osteomyelitis in an immunocompromised child. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 2398-2402.
- Bao, Y., Zhai, Z., Wang, S., Ma, J., Zhang, W., Lu, C., 2013. Chaperonin GroEL: a novel phylogenetically conserved protein with strong immunoreactivity of Avian Pathogenic *Escherichia coli* isolates from duck identified by immunoproteomics. *Vaccine* 31, 2947-2953.
- Barasona, J.A., Acevedo, P., Diez-Delgado, I., Queiros, J., Carrasco-Garcia, R., Gortazar, C., Vicente, J., 2016. Tuberculosis-Associated Death among Adult Wild Boars, Spain, 2009-2014. *Emerg Infect Dis* 22, 2178-2180.
- Barasona, J.A., Latham, M.C., Acevedo, P., Armenteros, J.A., Latham, A.D., Gortazar, C., Carro, F., Soriguer, R.C., Vicente, J., 2014. Spatiotemporal interactions between wild boar and cattle: implications for cross-species disease transmission. *Vet Res* 45, 122.
- Barasona, J.A., Vicente, J., Diez-Delgado, I., Aznar, J., Gortazar, C., Torres, M.J., 2017. Environmental Presence of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Aggregation Points at the Wildlife/Livestock Interface. *Transbound Emerg Dis* 64, 1148-1158.
- Barlow, A.M., Mitchell, K.A., Visram, K.H., 1999. Bovine tuberculosis in llama (*Lama glama*) in the UK. *Vet Rec* 145, 639-640.
- Ben Salah, I., Cayrou, C., Raoult, D., Drancourt, M., 2009. *Mycobacterium marseillense* sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium bouchedurhonense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* complex. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 2803-2808.

## Bibliografía

- Bennett, R.M., Cooke, R.J., 2006. Costs to farmers of a tuberculosis breakdown. *Vet Rec* 158, 429-432.
- Bergey's Manual of systematic Archaea and Bacteria, 2015. William Barnaby Whitman; Bergey's Manual Trust; Wiley Online Library.
- Bezoz, J., Alvarez, J., Juan, L., Romero, B., Rodriguez, S., Castellanos, E., Saez-Llorente, J.L., Mateos, A., Dominguez, L., Aranaz, A., 2011. Factors influencing the performance of an interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis in goats. *Vet J* 190, 131-135.
- Bezoz, J., Alvarez, J., Romero, B., Aranaz, A., Juan, L., 2012. Tuberculosis in goats: assessment of current in vivo cell-mediated and antibody-based diagnostic assays. *Vet J* 191, 161-165.
- Bezoz, J., Casal, C., Alvarez, J., Diez-Guerrier, A., Rodriguez-Bertos, A., Romero, B., Rueda, P., Lopez, L., Dominguez, L., de Juan, L., 2013. Evaluation of the performance of cellular and serological diagnostic tests for the diagnosis of tuberculosis in an alpaca (*Vicugna pacos*) herd naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Prev Vet Med* 111, 304-313.
- Bezoz, J., Casal, C., Romero, B., Liandris, E., Sanchez, N., Vigo, V., Dominguez, L., de Juan, L., 2015. Lack of interference with diagnostic testing for tuberculosis in goats experimentally exposed to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet J* 205, 113-115.
- Bezoz, J., Casal, C., Romero, B., Schroeder, B., Hardegger, R., Raeber, A.J., Lopez, L., Rueda, P., Dominguez, L., 2014a. Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci* 97 Suppl, S44-52.
- Bezoz, J., Romero, B., Delgado, A., Alvarez, J., Casal, C., Venteo, A., Gonzalez, I., Dominguez, L., de Juan, L., 2014b. Evaluation of the specificity of intradermal tuberculin and serological tests for diagnosis of tuberculosis in alpaca (*Vicugna pacos*) and llama (*Lama glama*) herds under field conditions in Peru. *Vet Rec* 174, 532.

- Bezoz, J., Roy, A., Infantes-Lorenzo, J.A., Gonzalez, I., Venteo, A., Romero, B., Grau, A., Minguez, O., Dominguez, L., de Juan, L., 2018. The use of serological tests in combination with the intradermal tuberculin test maximizes the detection of tuberculosis infected goats. *Vet Immunol Immunopathol* 199, 43-52.
- Bhatt, K., Verma, S., Ellner, J.J., Salgame, P., 2015. Quest for correlates of protection against tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 22, 258-266.
- Blein-Nicolas, M., Zivy, M., 2016. Thousand and one ways to quantify and compare protein abundances in label-free bottom-up proteomics. *Biochim Biophys Acta* 1864, 883-895.
- Boadella, M., Acevedo, P., Vicente, J., Mentaberre, G., Balseiro, A., Arnal, M., Martinez, D., Garcia-Bocanegra, I., Casal, C., Alvarez, J., Oleaga, A., Lavin, S., Munoz, M., Saez-Llorente, J.L., de la Fuente, J., Gortazar, C., 2011a. Spatio-temporal trends of Iberian wild boar contact with *Mycobacterium tuberculosis* complex detected by ELISA. *Ecohealth* 8, 478-484.
- Boadella, M., Barasona, J.A., Diaz-Sanchez, S., Lyashchenko, K.P., Greenwald, R., Esfandiari, J., Gortazar, C., 2012. Performance of immunochromatographic and ELISA tests for detecting fallow deer infected with *Mycobacterium bovis*. *Prev Vet Med* 104, 160-164.
- Boadella, M., Lyashchenko, K., Greenwald, R., Esfandiari, J., Jaroso, R., Carta, T., Garrido, J.M., Vicente, J., de la Fuente, J., Gortazar, C., 2011b. Serologic tests for detecting antibodies against *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Eurasian wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *J Vet Diagn Invest* 23, 77-83.
- Boddinghaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Blocker, H., Bottger, E.C., 1990. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 28, 1751-1759.
- Boland, F., Kelly, G.E., Good, M., More, S.J., 2010. Bovine tuberculosis and milk production in infected dairy herds in Ireland. *Prev Vet Med* 93, 153-161.



## Bibliografía

- Borsuk, S., Newcombe, J., Mendum, T.A., Dellagostin, O.A., McFadden, J., 2009. Identification of proteins from tuberculin purified protein derivative (PPD) by LC-MS/MS. *Tuberculosis (Edinb)* 89, 423-430.
- Boussiotis, V.A., Tsai, E.Y., Yunis, E.J., Thim, S., Delgado, J.C., Dascher, C.C., Berezovskaya, A., Rousset, D., Reynes, J.M., Goldfeld, A.E., 2000. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest* 105, 1317-1325.
- Brooks-Pollock, E., Conlan, A.J., Mitchell, A.P., Blackwell, R., McKinley, T.J., Wood, J.L., 2013. Age-dependent patterns of bovine tuberculosis in cattle. *Vet Res* 44, 97.
- Buddle, B.M., Wilson, T., Denis, M., Greenwald, R., Esfandiari, J., Lyashchenko, K.P., Liggett, S., Mackintosh, C.G., 2010. Sensitivity, specificity, and confounding factors of novel serological tests used for the rapid diagnosis of bovine tuberculosis in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *Clin Vaccine Immunol* 17, 626-630.
- Busch, F., Bannerman, F., Liggett, S., Griffin, F., Clarke, J., Lyashchenko, K.P., Rhodes, S., 2017. Control of bovine tuberculosis in a farmed red deer herd in England. *Vet Rec* 180, 68.
- Cannella, A.P., Tsolis, R.M., Liang, L., Felgner, P.L., Saito, M., Sette, A., Gotuzzo, E., Vinetz, J.M., 2012. Antigen-specific acquired immunity in human brucellosis: implications for diagnosis, prognosis, and vaccine development. *Front Cell Infect Microbiol* 2, 1.
- Cardoso-Toset, F., Luque, I., Amarilla, S.P., Gomez-Gascon, L., Fernandez, L., Huerta, B., Carrasco, L., Ruiz, P., Gomez-Laguna, J., 2015. Evaluation of rapid methods for diagnosis of tuberculosis in slaughtered free-range pigs. *Vet J* 204, 232-234.
- Cardoso-Toset, F., Luque, I., Carrasco, L., Jurado-Martos, F., Risalde, M.A., Venteo, A., Infantes-Lorenzo, J.A., Bezos, J., Rueda, P., Tapia, I., Gortazar, C., Dominguez, L., Dominguez, M., Gomez-Laguna, J., 2017. Evaluation of five serologic assays for bovine tuberculosis surveillance

- in domestic free-range pigs from southern Spain. *Prev Vet Med* 137, 101-104.
- Carralot, J.P., Lemmel, C., Stevanovic, S., Pascolo, S., 2008. Mass spectrometric identification of an HLA-A\*0201 epitope from *Plasmodium falciparum* MSP-1. *Int Immunol* 20, 1451-1456.
- Casadevall, A., Pirofski, L.A., 2006. A reappraisal of humoral immunity based on mechanisms of antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Adv Immunol* 91, 1-44.
- Casal, C., Alvarez, J., Bezos, J., Quick, H., Diez-Guerrier, A., Romero, B., Saez, J.L., Liandris, E., Navarro, A., Perez, A., Dominguez, L., de Juan, L., 2015. Effect of the inoculation site of bovine purified protein derivative (PPD) on the skin fold thickness increase in cattle from officially tuberculosis free and tuberculosis-infected herds. *Prev Vet Med* 121, 86-92.
- Casal, C., Diez-Guerrier, A., Alvarez, J., Rodriguez-Campos, S., Mateos, A., Linscott, R., Martel, E., Lawrence, J.C., Whelan, C., Clarke, J., O'Brien, A., Dominguez, L., Aranaz, A., 2014. Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. *Vet Microbiol* 170, 342-351.
- Casal, C., Infantes, J.A., Risalde, M.A., Diez-Guerrier, A., Dominguez, M., Moreno, I., Romero, B., de Juan, L., Saez, J.L., Juste, R., Gortazar, C., Dominguez, L., Bezos, J., 2017. Antibody detection tests improve the sensitivity of tuberculosis diagnosis in cattle. *Res Vet Sci* 112, 214-221.
- Castets, M., Sarrat, H., 1969. [Experimental study of the virulence of *Mycobacterium africanum* (preliminary note)]. *Bull Soc Med Afr Noire Lang Fr* 14, 693-696.
- Chambers, M.A., Lyashchenko, K.P., Greenwald, R., Esfandiari, J., James, E., Barker, L., Jones, J., Watkins, G., Rolfe, S., 2010. Evaluation of a rapid serological test for the determination of *Mycobacterium bovis* infection in badgers (*Meles meles*) found dead. *Clin Vaccine Immunol* 17, 408-411.

## Bibliografía

- Che' Amat, A., Gonzalez-Barrio, D., Ortiz, J.A., Diez-Delgado, I., Boadella, M., Barasona, J.A., Bezos, J., Romero, B., Armenteros, J.A., Lyashchenko, K.P., Venteo, A., Rueda, P., Gortazar, C., 2015. Testing Eurasian wild boar piglets for serum antibodies against *Mycobacterium bovis*. *Prev Vet Med* 121, 93-98.
- Chen, S.T., Li, J.Y., Zhang, Y., Gao, X., Cai, H., 2012. Recombinant MPT83 derived from *Mycobacterium tuberculosis* induces cytokine production and upregulates the function of mouse macrophages through TLR2. *J Immunol* 188, 668-677.
- Chen, T., Blanc, C., Eder, A.Z., Prados-Rosales, R., Souza, A.C., Kim, R.S., Glatman-Freedman, A., Joe, M., Bai, Y., Lowary, T.L., Tanner, R., Brennan, M.J., Fletcher, H.A., McShane, H., Casadevall, A., Achkar, J.M., 2016. Association of Human Antibodies to Arabinomannan With Enhanced *Mycobacterial* Opsonophagocytosis and Intracellular Growth Reduction. *J Infect Dis* 214, 300-310.
- Cho, Y.S., Dobos, K.M., Prenni, J., Yang, H., Hess, A., Rosenkrands, I., Andersen, P., Ryoo, S.W., Bai, G.H., Brennan, M.J., Izzo, A., Bielefeldt-Ohmann, H., Belisle, J.T., 2012. Deciphering the proteome of the in vivo diagnostic reagent "purified protein derivative" from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* 12, 979-991.
- Cho, Y.S., Jang, Y.B., Lee, S.E., Cho, J.Y., Ahn, J.M., Hwang, I., Heo, E., Nam, H.M., Cho, D., Her, M., Jean, Y.H., Jung, S.C., Kim, J.M., Lee, H.S., Lee, K., Belisle, J.T., 2015. Short communication: Proteomic characterization of tuberculin purified protein derivative from *Mycobacterium bovis*. *Res Vet Sci* 101, 117-119.
- Cima, G., 2014. Cat transmits TB to humans in UK. *J Am Vet Med Assoc* 244, 1116.
- Claman, H.N., Chaperon, E.A., Triplett, R.F., 1966. Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production. *Proc Soc Exp Biol Med* 122, 1167-1171.

- Clifton-Hadley, R.S., Sayers, A.R., Stock, M.P., 1995. Evaluation of an ELISA for *Mycobacterium bovis* infection in badgers (*Meles meles*). *Vet Rec* 137, 555-558.
- Coad, M., Clifford, D., Rhodes, S.G., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., Whelan, A.O., 2010. Repeat tuberculin skin testing leads to desensitisation in naturally infected tuberculous cattle which is associated with elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1 beta responses. *Vet Res* 41, 14.
- Coad, M., Clifford, D.J., Vordermeier, H.M., Whelan, A.O., 2013. The consequences of vaccination with the Johne's disease vaccine, Gudair, on diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet Rec* 172, 266.
- Coenen, D., Verschueren, P., Westhovens, R., Bossuyt, X., 2007. Technical and diagnostic performance of 6 assays for the measurement of citrullinated protein/peptide antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin Chem* 53, 498-504.
- Cohan, F.M., 2002. What are bacterial species? *Annu Rev Microbiol* 56, 457-487.
- Colaco, C.A., Bailey, C.R., Walker, K.B., Keeble, J., 2013. Heat shock proteins: stimulators of innate and acquired immunity. *Biomed Res Int* 2013, 461230.
- Collins, D.M., De Lisle, G.W., 1985. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the tuberculosis complex. *J Clin Microbiol* 21, 562-564.
- Cooney, R., J. Kazda, J. Quinn, B. Cook, K. Müller and M. Monaghan, 1997. Environmental mycobacteria in Ireland as a source of non-specific sensitisation to tuberculin. *Irish Veterinary Journal* 50, 370-373.
- Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer, H.F., de Kantor, I., Meslin, F.X., 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 4, 59-70.

## Bibliografía

- Cousins, D.V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., Duignan, P., Murray, A., Dupont, C., Ahmed, N., Collins, D.M., Butler, W.R., Dawson, D., Rodriguez, D., Loureiro, J., Romano, M.I., Alito, A., Zumarraga, M., Bernardelli, A., 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 1305-1314.
- Crawshaw, T.R., Griffiths, I.B., Clifton-Hadley, R.S., 2008. Comparison of a standard and a detailed postmortem protocol for detecting *Mycobacterium bovis* in badgers. *Vet Rec* 163, 473-477.
- Croce, M.V., Fejes, M., Riera, N., Minoldo, D.A., Segal-Eiras, A., 1985. Clinical importance of circulating immune complexes in human acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Immunol Immunother* 20, 91-95.
- Cruz-Fisher, M.I., Cheng, C., Sun, G., Pal, S., Teng, A., Molina, D.M., Kayala, M.A., Vigil, A., Baldi, P., Felgner, P.L., Liang, X., de la Maza, L.M., 2011. Identification of immunodominant antigens by probing a whole *Chlamydia trachomatis* open reading frame proteome microarray using sera from immunized mice. *Infect Immun* 79, 246-257.
- D'Alterio, G.L., Knowles, T.G., Eknaes, E.I., Loevland, I.E., Foster, A.P., 2006. Postal survey of the population of South American camelids in the United Kingdom in 2000/01. *Vet Rec* 158, 86-90.
- Davis, J.M., Ramakrishnan, L., 2009. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell* 136, 37-49.
- de Kantor, I.N., Ritacco, V., 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Vet Microbiol* 112, 111-118.
- de la Rua-Domenech, R., 2006. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 86, 77-109.

- Demine, R., Sherev, T., Walden, P., 2003. Biochemical determination of natural tumor-associated T-cell epitopes. *Mol Biotechnol* 25, 71-78.
- Di Marco, V., Mazzone, P., Capucchio, M.T., Boniotti, M.B., Aronica, V., Russo, M., Fiasconaro, M., Cifani, N., Corneli, S., Biasibetti, E., Biagetti, M., Pacciarini, M.L., Cagiola, M., Pasquali, P., Marianelli, C., 2012. Epidemiological significance of the domestic black pig (*Sus scrofa*) in maintenance of bovine tuberculosis in Sicily. *J Clin Microbiol* 50, 1209-1218.
- Dippenaar, A., Parsons, S.D.C., Sampson, S.L., van der Merwe, R.G., Drewe, J.A., Abdallah, A.M., Siame, K.K., Gey van Pittius, N.C., van Helden, P.D., Pain, A., Warren, R.M., 2015. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium suricattae*. *Tuberculosis (Edinb)* 95, 682-688.
- Doherty, M.L., Bassett, H.F., Quinn, P.J., Davis, W.C., Monaghan, M.L., 1995. Effects of dexamethasone on cell-mediated immune responses in cattle sensitized to *Mycobacterium bovis*. *Am J Vet Res* 56, 1300-1306.
- Doig, P., Kinsella, N., Guerry, P., Trust, T.J., 1996. Characterization of a post-translational modification of *Campylobacter* flagellin: identification of a sero-specific glycosyl moiety. *Mol Microbiol* 19, 379-387.
- Domingo, M., Vidal, E., Marco, A., 2014. Pathology of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci* 97 Suppl, S20-29.
- Domon, B., Aebersold, R., 2006. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 312, 212-217.
- Downs, S.H., Parry, J.E., Upton, P.A., Broughan, J.M., Goodchild, A.V., Nunez-Garcia, J., Greiner, M., Abernethy, D.A., Cameron, A.R., Cook, A.J., de la Rua-Domenech, R., Gunn, J., Pritchard, E., Rhodes, S., Rolfe, S., Sharp, M., Vordermeier, H.M., Watson, E., Welsh, M., Whelan, A.O., Woolliams, J.A., More, S.J., Clifton-Hadley, R.S., 2018. Methodology and preliminary results of a systematic literature review of ante-mortem and post-mortem diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Prev Vet Med* 153, 117-126.

## Bibliografía

- Duncan, M.W., 2007. Omics and its 15 minutes. *Exp Biol Med* (Maywood) 232, 471-472.
- EFSA, A., 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016.
- Ellis, M.D., Davies, S., McCandlish, I.A., Monies, R., Jahans, K., de la Rua-Domenech, R., 2006. *Mycobacterium bovis* infection in a dog. *Vet Rec* 159, 46-48.
- Farrell, K.W., Burns, R.G., 1975. Inability to detect *Chlamydomonas* microtubule assembly in vitro: possible implications to the in vivo regulation of microtubule assembly. *J Cell Sci* 17, 669-681.
- Ferraz, J.C., Melo, F.B., Albuquerque, M.F., Montenegro, S.M., Abath, F.G., 2006. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz J Med Biol Res* 39, 1387-1397.
- Flynn, J.L., Chan, J., 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19, 93-129.
- Francis, J., 1947. Bovine tuberculosis: including a contrast with human tuberculosis. Staples Press, London, UK.
- Fulton, K.M., Twine, S.M., 2013. Immunoproteomics: current technology and applications. *Methods Mol Biol* 1061, 21-57.
- Gey van Pittius, N.C., Perrett, K.D., Michel, A.L., Keet, D.F., Hlokwé, T., Streicher, E.M., Warren, R.M., van Helden, P.D., 2012. Infection of African buffalo (*Syncerus caffer*) by oryx bacillus, a rare member of the antelope clade of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Wildl Dis* 48, 849-857.
- Ghosh, J., Larsson, P., Singh, B., Pettersson, B.M., Islam, N.M., Sarkar, S.N., Dasgupta, S., Kirsebom, L.A., 2009. Sporulation in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 10781-10786.

- Glover, R.E., 1946. Susceptibility of the golden hamster (*Cricetus auratus*) to *Mycobacterium tuberculosis hominis* and *bovis*. *J Pathol Bacteriol* 58, 107-110.
- Goding, J.W., 1980. Antibody production by hybridomas. *J Immunol Methods* 39, 285-308.
- Good, M., Clegg, T.A., Murphy, F., More, S.J., 2011. The comparative performance of the single intradermal comparative tuberculin test in Irish cattle, using tuberculin PPD combinations from different manufacturers. *Vet Microbiol* 151, 77-84.
- Goodger, J., Russell, W.P., Nolan, A., Newell, D.G., 1994. Production and characterization of a monoclonal badger anti-immunoglobulin G and its use in defining the specificity of *Mycobacterium bovis* infection in badgers by western blot. *Vet Immunol Immunopathol* 40, 243-252.
- Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weiss, W., 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037-1053.
- Gormley, E., Doyle, M., Duignan, A., Good, M., More, S.J., Clegg, T.A., 2013. Identification of risk factors associated with disclosure of false positive bovine tuberculosis reactors using the gamma-interferon (IFN $\gamma$ ) assay. *Vet Res* 44, 117.
- Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzsimons, T., McGill, K., Collins, J.D., 2006. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Vet Microbiol* 112, 171-179.
- Gormley, E., Ni Bhuachalla, D., O'Keeffe, J., Murphy, D., Aldwell, F.E., Fitzsimons, T., Stanley, P., Tratalos, J.A., McGrath, G., Fogarty, N., Kenny, K., More, S.J., Messam, L.L., Corner, L.A., 2017. Oral Vaccination of Free-Living Badgers (*Meles meles*) with Bacille Calmette Guerin (BCG) Vaccine Confers Protection against Tuberculosis. *PLoS One* 12, e0168851.
- Gortazar, C., Fernandez-Calle, L.M., Collazos-Martinez, J.A., Minguez-Gonzalez, O., Acevedo, P., 2017. Animal tuberculosis maintenance at



## Bibliografía

- low abundance of suitable wildlife reservoir hosts: A case study in northern Spain. *Prev Vet Med* 146, 150-157.
- Gortazar, C., Vicente, J., Boadella, M., Ballesteros, C., Galindo, R.C., Garrido, J., Aranaz, A., de la Fuente, J., 2011. Progress in the control of bovine tuberculosis in Spanish wildlife. *Vet Microbiol* 151, 170-178.
- Grange, J.M., 1996. The biology of the genus *Mycobacterium*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 25, 1S-9S.
- Grange, J.M., Gibson, J., Osborn, T.W., Collins, C.H., Yates, M.D., 1983. What is BCG? *Tubercle* 64, 129-139.
- Greenwald, R., Esfandiari, J., Lesellier, S., Houghton, R., Pollock, J., Aagaard, C., Andersen, P., Hewinson, R.G., Chambers, M., Lyashchenko, K., 2003. Improved serodetection of *Mycobacterium bovis* infection in badgers (*Meles meles*) using multiantigen test formats. *Diagn Microbiol Infect Dis* 46, 197-203.
- Gumi, B., Schelling, E., Firdessa, R., Aseffa, A., Tschopp, R., Yamuah, L., Young, D., Zinsstag, J., 2011. Prevalence of bovine tuberculosis in pastoral cattle herds in the Oromia region, southern Ethiopia. *Trop Anim Health Prod* 43, 1081-1087.
- Gutierrez, M., Tellechea, J., Garcia Marin, J.F., 1998. Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. *Vet Microbiol* 62, 281-290.
- Habarugira, G., Rukelibuga, J., Nanyingi, M.O., Mushonga, B., 2014. Bovine tuberculosis in Rwanda: Prevalence and economic impact evaluation by meat inspection at Societe des Abattoirs de Nyabugogo-Nyabugogo Abattoir, Kigali. *J S Afr Vet Assoc* 85, 1062.
- Harboe, M., 1981. Antigens of PPD, old tuberculin, and autoclaved *Mycobacterium bovis* BCG studied by crossed immunoelectrophoresis. *Am Rev Respir Dis* 124, 80-87.
- Hardouin, J., Lasserre, J.P., Canelle, L., Duchateau, M., Vlieghe, C., Choquet-Kastylevsky, G., Joubert-Caron, R., Caron, M., 2007a. Usefulness of

- autoantigens depletion to detect autoantibody signatures by multiple affinity protein profiling. *J Sep Sci* 30, 352-358.
- Hardouin, J., Lasserre, J.P., Sylvius, L., Joubert-Caron, R., Caron, M., 2007b. Cancer immunomics: from serological proteome analysis to multiple affinity protein profiling. *Ann N Y Acad Sci* 1107, 223-230.
- Havlir, D.V., Barnes, P.F., 1999. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 340, 367-373.
- Hawkins, O.E., Vangundy, R.S., Eckerd, A.M., Bardet, W., Buchli, R., Weidanz, J.A., Hildebrand, W.H., 2008. Identification of breast cancer peptide epitopes presented by HLA-A\*0201. *J Proteome Res* 7, 1445-1457.
- Hiki, Y., 2009. O-linked oligosaccharides of the IgA1 hinge region: roles of its aberrant structure in the occurrence and/or progression of IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 13, 415-423.
- Hirsch, C.S., Ellner, J.J., Blinkhorn, R., Toossi, Z., 1997. In vitro restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against *Mycobacterium tuberculosis* by natural inhibitors of transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3926-3931.
- Ho, M.M., Kairo, S.K., Corbel, M.J., 2006. Tuberculin purified protein derivative (PPD) immunoassay as an in vitro alternative assay for identity and confirmation of potency. *Hum Vaccin* 2, 29-33.
- Hsieh, E.J., Bereman, M.S., Durand, S., Valaskovic, G.A., MacCoss, M.J., 2013. Effects of column and gradient lengths on peak capacity and peptide identification in nanoflow LC-MS/MS of complex proteomic samples. *J Am Soc Mass Spectrom* 24, 148-153.
- Huebner, R.E., Schein, M.F., Bass, J.B., Jr., 1993. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis* 17, 968-975.
- Humblet, M.F., Boschirolì, M.L., Saegerman, C., 2009. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *Vet Res* 40, 50.

## Bibliografía

- Infantes-Lorenzo, J.A., Moreno, I., Riscalde, M.L.A., Roy, A., Villar, M., Romero, B., Ibarrola, N., de la Fuente, J., Puentes, E., de Juan, L., Gortazar, C., Bezos, J., Dominguez, L., Dominguez, M., 2017. Proteomic characterisation of bovine and avian purified protein derivatives and identification of specific antigens for serodiagnosis of bovine tuberculosis. *Clin Proteomics* 14, 36.
- Jacobs, A.J., Mongkolsapaya, J., Screaton, G.R., McShane, H., Wilkinson, R.J., 2016. Antibodies and tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 101, 102-113.
- Jacobs, E.C., 1957. Tuberculosis: yet an unconquered disease. *Mil Med* 120, 1-13.
- Jasenosky, L.D., Scriba, T.J., Hanekom, W.A., Goldfeld, A.E., 2015. T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Immunol Rev* 264, 74-87.
- Jeffery, C.J., 2009. Moonlighting proteins--an update. *Mol Biosyst* 5, 345-350.
- Jones, G.J., Pirson, C., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., 2010. Simultaneous measurement of antigen-stimulated interleukin-1 beta and gamma interferon production enhances test sensitivity for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Clin Vaccine Immunol* 17, 1946-1951.
- Jungblut, P.R., 2001. Proteome analysis of bacterial pathogens. *Microbes Infect* 3, 831-840.
- Karlson, A.G., Carr, D.T., 1970. Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. Report of sex cases: 1954-1968. *Ann Intern Med* 73, 979-983.
- Kassa, G.M., Abebe, F., Worku, Y., Legesse, M., Medhin, G., Bjune, G., Ameni, G., 2012. Tuberculosis in Goats and Sheep in Afar Pastoral Region of Ethiopia and Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* from Goat. *Vet Med Int* 2012, 869146.
- Keck, N., Dutruel, H., Smyej, F., Nodet, M., Boschirolì, M.L., 2010. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in a Camargue horse. *Vet Rec* 166, 499-500.

- Kehrli, M.E., Jr., Nonnecke, B.J., Roth, J.A., 1989. Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. *Am J Vet Res* 50, 215-220.
- Kindt, J.T., A. R. Goldsby, B. A. Osborne and J. Kuby,, 2007. *Kuby immunology* 6th ed.
- Kipar, A., Burthe, S.J., Hetzel, U., Rokia, M.A., Telfer, S., Lambin, X., Birtles, R.J., Begon, M., Bennett, M., 2014. *Mycobacterium microti* tuberculosis in its maintenance host, the field vole (*Microtus agrestis*): characterization of the disease and possible routes of transmission. *Vet Pathol* 51, 903-914.
- Koch, R. 1882. Die aetiologie der tuberculose. In *Berliner klinische Wochenschrift* (Berlin), 221-230.
- Kolaskar, A.S., Tongaonkar, P.C., 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett* 276, 172-174.
- Koller-Jones, M.A. 2010. National Bovine Tuberculosis (TB) Eradication Program. Canadian Food Inspection Agency. 1-16.
- Korbel, D.S., Schneider, B.E., Schaible, U.E., 2008. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes Infect* 10, 995-1004.
- Kukielka, E., Barasona, J.A., Cowie, C.E., Drewe, J.A., Gortazar, C., Cotarelo, I., Vicente, J., 2013. Spatial and temporal interactions between livestock and wildlife in South Central Spain assessed by camera traps. *Prev Vet Med* 112, 213-221.
- Kunnath-Velayudhan, S., Salamon, H., Wang, H.Y., Davidow, A.L., Molina, D.M., Huynh, V.T., Cirillo, D.M., Michel, G., Talbot, E.A., Perkins, M.D., Felgner, P.L., Liang, X., Gennaro, M.L., 2010. Dynamic antibody responses to the *Mycobacterium tuberculosis* proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14703-14708.
- Lahner, E., Bernardini, G., Possenti, S., Renzone, G., Scaloni, A., Santucci, A., Annibale, B., 2011. Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection

## Bibliografía

- in patients with atrophic body gastritis, a predisposing condition for gastric cancer. *Int J Med Microbiol* 301, 125-132.
- Lahner, E., Bernardini, G., Santucci, A., Annibale, B., 2010. *Helicobacter pylori* immunoproteomics in gastric cancer and gastritis of the carcinoma phenotype. *Expert Rev Proteomics* 7, 239-248.
- Lay, G., Poquet, Y., Salek-Peyron, P., Puissegur, M.P., Botanch, C., Bon, H., Levillain, F., Duteyrat, J.L., Emile, J.F., Altare, F., 2007. Langhans giant cells from *M. tuberculosis*-induced human granulomas cannot mediate mycobacterial uptake. *J Pathol* 211, 76-85.
- Lechevalier, H., Lechevalier M, Gerber, N, 1970. Chemical Composition as a Criterion in the Classification of Actinomycete. *Advances in applied microbiology* 14, 47-72.
- Lee, E.Y., Choi, D.S., Kim, K.P., Gho, Y.S., 2008. Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrom Rev* 27, 535-555.
- Lee, S.J., Liang, L., Juarez, S., Nanton, M.R., Gondwe, E.N., Msefula, C.L., Kayala, M.A., Necchi, F., Heath, J.N., Hart, P., Tsois, R.M., Heyderman, R.S., MacLennan, C.A., Felgner, P.L., Davies, D.H., McSorley, S.J., 2012. Identification of a common immune signature in murine and human systemic Salmonellosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 4998-5003.
- Lee, S.Y., Jeoung, D., 2007. The reverse proteomics for identification of tumor antigens. *J Microbiol Biotechnol* 17, 879-890.
- Lepper, A.W., Pearson, C.W., Corner, L.A., 1977. Anergy to tuberculin in beef cattle. *Aust Vet J* 53, 214-216.
- Li, H., Javid, B., 2018. Antibodies and tuberculosis: finally coming of age? *Nat Rev Immunol*.
- Li, H., Wang, X.X., Wang, B., Fu, L., Liu, G., Lu, Y., Cao, M., Huang, H., Javid, B., 2017. Latently and uninfected healthcare workers exposed to TB make protective antibodies against *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 5023-5028.

- Liebana, E., Girvin, R.M., Welsh, M., Neill, S.D., Pollock, J.M., 1999. Generation of CD8(+) T-cell responses to *Mycobacterium bovis* and mycobacterial antigen in experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun* 67, 1034-1044.
- Lin, P.L., Flynn, J.L., 2015. CD8 T cells and *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Semin Immunopathol* 37, 239-249.
- Lin, P.L., Plessner, H.L., Voitenok, N.N., Flynn, J.L., 2007. Tumor necrosis factor and tuberculosis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 12, 22-25.
- Liu, P., Overman, R.G., Yates, N.L., Alam, S.M., Vandergrift, N., Chen, Y., Graw, F., Freel, S.A., Kappes, J.C., Ochsenbauer, C., Montefiori, D.C., Gao, F., Perelson, A.S., Cohen, M.S., Haynes, B.F., Tomaras, G.D., 2011. Dynamic antibody specificities and virion concentrations in circulating immune complexes in acute to chronic HIV-1 infection. *J Virol* 85, 11196-11207.
- Lomme, J.R., Thoen, C.O., Himes, E.M., Vinson, J.W., King, R.E., 1976. *Mycobacterium tuberculosis* infection in two East African oryxes. *J Am Vet Med Assoc* 169, 912-914.
- Lu, L.L., Chung, A.W., Rosebrock, T.R., Ghebremichael, M., Yu, W.H., Grace, P.S., Schoen, M.K., Tafesse, F., Martin, C., Leung, V., Mahan, A.E., Sips, M., Kumar, M.P., Tedesco, J., Robinson, H., Tkachenko, E., Draghi, M., Freedberg, K.J., Streeck, H., Suscovich, T.J., Lauffenburger, D.A., Restrepo, B.I., Day, C., Fortune, S.M., Alter, G., 2016. A Functional Role for Antibodies in Tuberculosis. *Cell* 167, 433-443 e414.
- Lyashchenko, K.P., Grandison, A., Keskinen, K., Sikar-Gang, A., Lambotte, P., Esfandiari, J., Ireton, G.C., Vallur, A., Reed, S.G., Jones, G., Vordermeier, H.M., Stabel, J.R., Thacker, T.C., Palmer, M.V., Waters, W.R., 2017. Identification of Novel Antigens Recognized by Serum Antibodies in Bovine Tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 24.
- Lyashchenko, K.P., Greenwald, R., Esfandiari, J., Rhodes, S., Dean, G., de la Rua-Domenech, R., Meylan, M., Vordermeier, H.M., Zanolari, P., 2011. Diagnostic value of animal-side antibody assays for rapid detection of

## Bibliografía

- Mycobacterium bovis or Mycobacterium microti infection in South American camelids. Clin Vaccine Immunol 18, 2143-2147.
- Manning, M.C., Chou, D.K., Murphy, B.M., Payne, R.W., Katayama, D.S., 2010. Stability of protein pharmaceuticals: an update. Pharm Res 27, 544-575.
- MAPAMA 2017. Informe final técnico del programa nacional de la tuberculosis bovina.
- Marassi, C., Almeida, C., Pinheiro, S., Vasconcellos, S., Lilenbaum, W., 2009. The use of MPB70-ELISA for the diagnosis of caprine tuberculosis in Brazil. Vet Res Commun 33, 937-943.
- Marianelli, C., Cifani, N., Capucchio, M.T., Fiasconaro, M., Russo, M., La Mancusa, F., Pasquali, P., Di Marco, V., 2010. A case of generalized bovine tuberculosis in a sheep. J Vet Diagn Invest 22, 445-448.
- Mayer, G., 2006. Cells of the Immune System and Antigen Recognition.
- McCallan, L., Brooks, C., Couzens, C., Young, F., McNair, J., Byrne, A.W., 2017. Assessment of serological tests for diagnosis of bovine tuberculosis. Vet Rec 181, 90.
- McNair, J., Welsh, M.D., Pollock, J.M., 2007. The immunology of bovine tuberculosis and progression toward improved disease control strategies. Vaccine 25, 5504-5511.
- Meng, C., Wan, T., Xu, Z., Liu, Y., Shan, F., Sun, L., Yin, Y., Chen, X., Jiao, X., 2015. Screening putative antigens as stimulators in the Mycobacterium bovis interferon-gamma release assay for cattle. Vet Immunol Immunopathol 168, 111-117.
- Michel, A.L., 2002. Implications of tuberculosis in African wildlife and livestock. Ann N Y Acad Sci 969, 251-255.
- Mijs, W., de Haas, P., Rossau, R., Van der Laan, T., Rigouts, L., Portaels, F., van Soolingen, D., 2002. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation Mycobacterium avium subsp. avium for bird-

- type isolates and 'M. avium subsp. hominissuis' for the human/porcine type of M. avium. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 1505-1518.
- Minnikin, D.E., Goodfellow, M., 1980. Lipid composition in the classification and identification of acid-fast bacteria. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 8, 189-256.
- Monies, R.J., Head, J.C., 1999. Bovine tuberculosis in housed calves. *Vet Rec* 145, 743.
- Morris, R.S., Pfeiffer, D.U., Jackson, R., 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet Microbiol* 40, 153-177.
- Munoz-Mendoza, M., Marreros, N., Boadella, M., Gortazar, C., Menendez, S., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Copano, M.F., Amado, J., Saez, J.L., Mourelo, J., Balseiro, A., 2013. Wild boar tuberculosis in Iberian Atlantic Spain: a different picture from Mediterranean habitats. *BMC Vet Res* 9, 176.
- Munoz-Mendoza, M., Romero, B., Del Cerro, A., Gortazar, C., Garcia-Marin, J.F., Menendez, S., Mourelo, J., de Juan, L., Saez, J.L., Delahay, R.J., Balseiro, A., 2016. Sheep as a Potential Source of Bovine TB: Epidemiology, Pathology and Evaluation of Diagnostic Techniques. *Transbound Emerg Dis* 63, 635-646.
- Munoz Mendoza, M., Juan, L., Menendez, S., Ocampo, A., Mourelo, J., Saez, J.L., Dominguez, L., Gortazar, C., Garcia Marin, J.F., Balseiro, A., 2012. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* in sheep. *Vet J* 191, 267-269.
- Murcia, M.I., Tortoli, E., Menendez, M.C., Palenque, E., Garcia, M.J., 2006. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 2049-2054.
- Murphy, D., Gormley, E., Costello, E., O'Meara, D., Corner, L.A., 2010. The prevalence and distribution of *Mycobacterium bovis* infection in



## Bibliografía

- European badgers (*Meles meles*) as determined by enhanced post mortem examination and bacteriological culture. *Res Vet Sci* 88, 1-5.
- Napp, S., Allepuz, A., Mercader, I., Nofrarias, M., Lopez-Soria, S., Domingo, M., Romero, B., Bezos, J., Perez de Val, B., 2013. Evidence of goats acting as domestic reservoirs of bovine tuberculosis. *Vet Rec* 172, 663.
- Naranjo, V., Gortazar, C., Vicente, J., de la Fuente, J., 2008. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet Microbiol* 127, 1-9.
- Neill, S.D., Cassidy, J., Hanna, J., Mackie, D.P., Pollock, J.M., Clements, A., Walton, E., Bryson, D.G., 1994. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Vet Rec* 135, 134-135.
- Nesvizhskii, A.I., 2007. Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching. *Methods Mol Biol* 367, 87-119.
- Nugent, G., Gortazar, C., Knowles, G., 2015. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* in wild deer and feral pigs and their roles in the establishment and spread of bovine tuberculosis in New Zealand wildlife. *N Z Vet J* 63 Suppl 1, 54-67.
- O'Brien, A., Whelan, C., Clarke, J.B., Hayton, A., Watt, N.J., Harkiss, G.D., 2017. Serological Analysis of Tuberculosis in Goats by Use of the Enferplex Caprine TB Multiplex Test. *Clin Vaccine Immunol* 24.
- O'Reilly, L.M., Daborn, C.J., 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis* 76 Suppl 1, 1-46.
- Ohshima, K., Kuroda, N., 2012. Proteomic approaches to profiling the humoral immune response and identifying disease-associated antigens. *Biol Pharm Bull* 35, 1409-1412.
- OIE 2009. Bovine tuberculosis. The tuberculin test. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.4.7: Bovine tuberculosis adopted

[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2008/pdf/2.04.07\\_BOVINE\\_TB.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.04.07_BOVINE_TB.pdf).

OIE 2018. Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2018. <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2018/>.

OMS, 2018. <http://www.who.int/es>.

Palmer, M.V., 2007. Tuberculosis: a reemerging disease at the interface of domestic animals and wildlife. *Curr Top Microbiol Immunol* 315, 195-215.

Palmer, M.V., 2013. *Mycobacterium bovis*: characteristics of wildlife reservoir hosts. *Transbound Emerg Dis* 60 Suppl 1, 1-13.

Palmer, M.V., Waters, W.R., Whipple, D.L., 2004. Investigation of the transmission of *Mycobacterium bovis* from deer to cattle through indirect contact. *Am J Vet Res* 65, 1483-1489.

Pandey, A., Mann, M., 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405, 837-846.

Parker, D.C., 1993. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 11, 331-360.

Parra, A., Larrasa, J., Garcia, A., Alonso, J.M., de Mendoza, J.H., 2005. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: a first approach to risk factor analysis. *Vet Microbiol* 110, 293-300.

Perera, P.Y., Lichy, J.H., Waldmann, T.A., Perera, L.P., 2012. The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. *Microbes Infect* 14, 247-261.

Pesciaroli, M., Alvarez, J., Boniotti, M.B., Cagiola, M., Di Marco, V., Marianelli, C., Pacciarini, M., Pasquali, P., 2014. Tuberculosis in domestic animal species. *Res Vet Sci* 97 Suppl, S78-85.

## Bibliografía

- Pieters, J., Gatfield, J., 2002. Hijacking the host: survival of pathogenic mycobacteria inside macrophages. *Trends Microbiol* 10, 142-146.
- Pollock, C., 2012. Mycobacterial infection in the ferret. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 15, 121-129, vii.
- Pollock, J.M., Neill, S.D., 2002. Mycobacterium bovis infection and tuberculosis in cattle. *Vet J* 163, 115-127.
- Pollock, J.M., Welsh, M.D., McNair, J., 2005. Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Vet Immunol Immunopathol* 108, 37-43.
- Prasad, T.S., Verma, R., Kumar, S., Nirujogi, R.S., Sathe, G.J., Madugundu, A.K., Sharma, J., Puttamallesh, V.N., Ganjiwale, A., Myneedu, V.P., Chatterjee, A., Pandey, A., Harsha, H., Narayana, J., 2013. Proteomic analysis of purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis. *Clin Proteomics* 10, 8.
- Purohit, M.R., Mustafa, T., Wiker, H.G., Morkve, O., Sviland, L., 2007. Immunohistochemical diagnosis of abdominal and lymph node tuberculosis by detecting Mycobacterium tuberculosis complex specific antigen MPT64. *Diagn Pathol* 2, 36.
- Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., Lelong, C., 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J Proteomics* 73, 2064-2077.
- Ratanji, K.D., Derrick, J.P., Dearman, R.J., Kimber, I., 2014. Immunogenicity of therapeutic proteins: influence of aggregation. *J Immunotoxicol* 11, 99-109.
- Ratcliffe, L.T., Lukey, P.T., MacKenzie, C.R., Ress, S.R., 1994. Reduced NK activity correlates with active disease in HIV- patients with multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 97, 373-379.
- Ravetch, J.V., Clynes, R.A., 1998. Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annu Rev Immunol* 16, 421-432.

- Reed, G.B., 1957. Genus *Mycobacterium* (species affecting warm-blooded animal except those causing leprosy).
- Reviriego Gordejo, F.J., Vermeersch, J.P., 2006. Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. *Vet Microbiol* 112, 101-109.
- Rhodes, S., Holder, T., Clifford, D., Dexter, I., Brewer, J., Smith, N., Waring, L., Crawshaw, T., Gillgan, S., Lyashchenko, K., Lawrence, J., Clarke, J., de la Rua-Domenech, R., Vordermeier, M., 2012. Evaluation of gamma interferon and antibody tuberculosis tests in alpacas. *Clin Vaccine Immunol* 19, 1677-1683.
- Riojas, M.A., McGough, K.J., Rider-Riojas, C.J., Rastogi, N., Hazbon, M.H., 2018. Phylogenomic analysis of the species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex demonstrates that *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* and *Mycobacterium pinnipedii* are later heterotypic synonyms of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 68, 324-332.
- Risalde, M.A., Molina, V., Sanchez-Cordon, P.J., Romero-Palomo, F., Pedrera, M., Gomez-Villamandos, J.C., 2015. Effects of Preinfection With Bovine Viral Diarrhea Virus on Immune Cells From the Lungs of Calves Inoculated With Bovine Herpesvirus 1.1. *Vet Pathol* 52, 644-653.
- Ritchie, J.N., 1959. Bovine tuberculosis: the end in sight. *R Soc Health J* 79, 461-469.
- Robinson, R.T., Orme, I.M., Cooper, A.M., 2015. The onset of adaptive immunity in the mouse model of tuberculosis and the factors that compromise its expression. *Immunol Rev* 264, 46-59.
- Roozendaal, R., Carroll, M.C., 2007. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunol Rev* 219, 157-166.
- Rosenberg, A.S., 2006. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J* 8, E501-507.
- Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J.C., Wood, P.R., 1992. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle:

## Bibliografía

- conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Aust Vet J* 69, 1-4.
- Runyon, E.H., 1967. *Micobacterium intracellulare*. *Am Rev Respir Dis* 95, 861-865.
- Ryan, E., Dwyer, P., Connolly, D., Fagan, J., Costello, E., More, S., 2008. Tuberculosis in alpaca (*Lama pacos*) on a farm in Ireland. 1. A clinical report. *Ir Vet J* 61, 527-531.
- Santos, N., Almeida, V., Gortazar, C., Correia-Neves, M., 2015. Patterns of *Mycobacterium tuberculosis*-complex excretion and characterization of super-shedders in naturally-infected wild boar and red deer. *Vet Res* 46, 129.
- Santos, N., Geraldes, M., Afonso, A., Almeida, V., Correia-Neves, M., 2010. Diagnosis of tuberculosis in the wild boar (*Sus scrofa*): a comparison of methods applicable to hunter-harvested animals. *PLoS One* 5.
- Sauerborn, M., Brinks, V., Jiskoot, W., Schellekens, H., 2010. Immunological mechanism underlying the immune response to recombinant human protein therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 31, 53-59.
- Schiller, I., Oesch, B., Vordermeier, H.M., Palmer, M.V., Harris, B.N., Orloski, K.A., Buddle, B.M., Thacker, T.C., Lyashchenko, K.P., Waters, W.R., 2010. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transbound Emerg Dis* 57, 205-220.
- Schiller, I., Waters, W.R., Vordermeier, H.M., Jemmi, T., Welsh, M., Keck, N., Whelan, A., Gormley, E., Boschirolì, M.L., Moyon, J.L., Vela, C., Cagiola, M., Buddle, B.M., Palmer, M., Thacker, T., Oesch, B., 2011. Bovine tuberculosis in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: trade, surveillance and diagnostics. *Vet Microbiol* 151, 153-159.
- Schwendener, R.A., 2014. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Ther Adv Vaccines* 2, 159-182.

- Seibert, F.B., 1941. The Chemistry of the Proteins of the Acid-Fast Bacilli. *Bacteriol Rev* 5, 69-95.
- Seward, R.J., Drouin, E.E., Steere, A.C., Costello, C.E., 2011. Peptides presented by HLA-DR molecules in synovia of patients with rheumatoid arthritis or antibiotic-refractory Lyme arthritis. *Mol Cell Proteomics* 10, M110 002477.
- Sharpe, A.E., Brady, C.P., Johnson, A.J., Byrne, W., Kenny, K., Costello, E., 2010. Concurrent outbreak of tuberculosis and caseous lymphadenitis in a goat herd. *Vet Rec* 166, 591-592.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., Mann, M., 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1, 2856-2860.
- Siuzdak, G., Bothner, B., Yeager, M., Brugidou, C., Fauquet, C.M., Hoey, K., Chang, C.M., 1996. Mass spectrometry and viral analysis. *Chem Biol* 3, 45-48.
- Solomon, S., Kassahn, D., Illges, H., 2005. The role of the complement and the Fc gamma R system in the pathogenesis of arthritis. *Arthritis Res Ther* 7, 129-135.
- Souza, Il, Melo, E.S., Ramos, C.A., Farias, T.A., Osorio, A.L., Jorge, K.S., Vidal, C.E., Silva, A.S., Silva, M.R., Pellegrin, A.O., Araujo, F.R., 2012. Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosis of bovine tuberculosis. *Springerplus* 1, 77.
- Stahl, D.A., Urbance, J.W., 1990. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J Bacteriol* 172, 116-124.
- Standing, K.G., 2003. Peptide and protein de novo sequencing by mass spectrometry. *Curr Opin Struct Biol* 13, 595-601.
- Steen, H., Warren, W.P., Desai, M., Gautam, S., Lai, S., Heath, S., Stuber, M., Lima, J.A., 2004. Combined transesophageal and surface MRI

## Bibliografía

- provides optimal imaging in aortic atherosclerosis. *J Cardiovasc Magn Reson* 6, 909-916.
- Storkus, W.J., Zeh, H.J., 3rd, Salter, R.D., Lotze, M.T., 1993. Identification of T-cell epitopes: rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 14, 94-103.
- Stults, J.T., Arnott, D., 2005. Proteomics. *Methods Enzymol* 402, 245-289.
- Sumi, S., Radhakrishnan, V., 2009. Evaluation of immunohistochemistry with a panel of antibodies against recombinant mycobacterial antigens for the diagnosis of tuberculous lymphadenitis. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* 1, 215-219.
- Thiede, B., Hohenwarter, W., Krah, A., Mattow, J., Schmid, M., Schmidt, F., Jungblut, P.R., 2005. Peptide mass fingerprinting. *Methods* 35, 237-247.
- Thoen, C.O., 2008. *Mycobacterium bovis* infection in animals and human.
- Thorel, M.F., Krichevsky, M., Levy-Frebault, V.V., 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 40, 254-260.
- Tollefsen, S., Pollock, J.M., Lea, T., Harboe, M., Wiker, H.G., 2003. T- and B-cell epitopes in the secreted *Mycobacterium bovis* antigen MPB70 in mice. *Scand J Immunol* 57, 151-161.
- Tomlinson, A.J., Chambers, M.A., McDonald, R.A., Delahay, R.J., 2015. Association of quantitative interferon-gamma responses with the progression of naturally acquired *Mycobacterium bovis* infection in wild European badgers (*Meles meles*). *Immunology* 144, 263-270.
- Tortoli, E., 2012. Phylogeny of the genus *Mycobacterium*: many doubts, few certainties. *Infect Genet Evol* 12, 827-831.

- Tortoli, E., Fedrizzi, T., Meehan, C.J., Trovato, A., Grottola, A., Giacobazzi, E., Serpini, G.F., Tagliazucchi, S., Fabio, A., Bettua, C., Bertorelli, R., Frascaro, F., De Sanctis, V., Pecorari, M., Jousson, O., Segata, N., Cirillo, D.M., 2017. The new phylogeny of the genus *Mycobacterium*: The old and the news. *Infect Genet Evol* 56, 19-25.
- Tortoli, E., Rindi, L., Garcia, M.J., Chiaradonna, P., Dei, R., Garzelli, C., Kroppenstedt, R.M., Lari, N., Mattei, R., Mariottini, A., Mazzarelli, G., Murcia, M.I., Nanetti, A., Piccoli, P., Scarparo, C., 2004. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1277-1285.
- Tschopp, R., Bobosha, K., Aseffa, A., Schelling, E., Habtamu, M., Iwnetu, R., Hailu, E., Firdessa, R., Hussein, J., Young, D., Zinsstag, J., 2011. Bovine tuberculosis at a cattle-small ruminant-human interface in Meskan, Gurage region, Central Ethiopia. *BMC Infect Dis* 11, 318.
- Turenne, C.Y., Thibert, L., Williams, K., Burdz, T.V., Cook, V.J., Wolfe, J.N., Cockcroft, D.W., Kabani, A., 2004. *Mycobacterium saskatchewanense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic species from human clinical isolates related to *Mycobacterium interjectum* and Accuprobe-positive for *Mycobacterium avium* complex. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 659-667.
- Twomey, D.F., Collins, R., Cranwell, M.P., Crawshaw, T.R., Higgins, R.J., Dean, G.S., Vordermeier, H.M., Hollingdale, A., de la Rua-Domenech, R., 2012. Controlling tuberculosis in a llama (*Lama glama*) herd using clinical signs, tuberculin skin testing and serology. *Vet J* 192, 246-248.
- Twomey, D.F., Crawshaw, T.R., Anscombe, J.E., Farrant, L., Evans, L.J., McElligott, W.S., Higgins, R.J., Dean, G., Vordermeier, M., Jahans, K., de la Rua-Domenech, R., 2007. TB in llamas caused by *Mycobacterium bovis*. *Vet Rec* 160, 170.
- Ulrichs, T., Kaufmann, S.H., 2003. [Immunology of tuberculosis: impact on the development of novel vaccines]. *Internist (Berl)* 44, 1374-1384.



## Bibliografía

- van der Burgt, G.M., Drummond, F., Crawshaw, T., Morris, S., 2013. An outbreak of tuberculosis in Lleyn sheep in the UK associated with clinical signs. *Vet Rec* 172, 69.
- van Ingen, J., Boeree, M.J., Kusters, K., Wieland, A., Tortoli, E., Dekhuijzen, P.N., van Soolingen, D., 2009. Proposal to elevate *Mycobacterium avium* complex ITS sequevar MAC-Q to *Mycobacterium vulneris* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 2277-2282.
- van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., de Haas, P.E., Hermans, P.W., Koedam, M.A., Teppema, K.S., Brennan, P.J., Besra, G.S., Portaels, F., Top, J., Schouls, L.M., van Embden, J.D., 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol* 47, 1236-1245.
- van Stralen, K.J., Stel, V.S., Reitsma, J.B., Dekker, F.W., Zoccali, C., Jager, K.J., 2009. Diagnostic methods I: sensitivity, specificity, and other measures of accuracy. *Kidney Int* 75, 1257-1263.
- Verma, A., Arora, S.K., Kuravi, S.K., Ramphal, R., 2005. Roles of specific amino acids in the N terminus of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and of flagellin glycosylation in the innate immune response. *Infect Immun* 73, 8237-8246.
- Vicente, J., Barasona, J.A., Acevedo, P., Ruiz-Fons, J.F., Boadella, M., Diez-Delgado, I., Beltran-Beck, B., Gonzalez-Barrio, D., Queiros, J., Montoro, V., de la Fuente, J., Gortazar, C., 2013. Temporal trend of tuberculosis in wild ungulates from Mediterranean Spain. *Transbound Emerg Dis* 60 Suppl 1, 92-103.
- Vicente, J., Hofle, U., Garrido, J.M., Fernandez-De-Mera, I.G., Juste, R., Barral, M., Gortazar, C., 2006. Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Vet Res* 37, 107-119.
- Vordermeier, H.M., Brown, J., Cockle, P.J., Franken, W.P., Drijfhout, J.W., Arend, S.M., Ottenhoff, T.H., Jahans, K., Hewinson, R.G., 2007. Assessment of cross-reactivity between *Mycobacterium bovis* and *M. kansasii* ESAT-

- 6 and CFP-10 at the T-cell epitope level. *Clin Vaccine Immunol* 14, 1203-1209.
- Vordermeier, H.M., Chambers, M.A., Buddle, B.M., Pollock, J.M., Hewinson, R.G., 2006. Progress in the development of vaccines and diagnostic reagents to control tuberculosis in cattle. *Vet J* 171, 229-244.
- Vordermeier, H.M., Cockle, P.J., Whelan, A.O., Rhodes, S., Hewinson, R.G., 2000. Toward the development of diagnostic assays to discriminate between *Mycobacterium bovis* infection and bacille Calmette-Guerin vaccination in cattle. *Clin Infect Dis* 30 Suppl 3, S291-298.
- Wagner, J.C., Buchanan, G., Bokkenheuser, V., Leviser, S., 1958. An acid-fast bacillus isolated from the lungs of the Cape hyrax, *Procavia capensis* (Pallas). *Nature* 181, 284-285.
- Waters, W.R., Buddle, B.M., Vordermeier, H.M., Gormley, E., Palmer, M.V., Thacker, T.C., Bannantine, J.P., Stabel, J.R., Linscott, R., Martel, E., Milian, F., Foshaug, W., Lawrence, J.C., 2011a. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clin Vaccine Immunol* 18, 1882-1888.
- Waters, W.R., Palmer, M.V., Stafne, M.R., Bass, K.E., Maggioli, M.F., Thacker, T.C., Linscott, R., Lawrence, J.C., Nelson, J.T., Esfandiari, J., Greenwald, R., Lyashchenko, K.P., 2015. Effects of Serial Skin Testing with Purified Protein Derivative on the Level and Quality of Antibodies to Complex and Defined Antigens in *Mycobacterium bovis*-Infected Cattle. *Clin Vaccine Immunol* 22, 641-649.
- Waters, W.R., Palmer, M.V., Thacker, T.C., Davis, W.C., Sreevatsan, S., Coussens, P., Meade, K.G., Hope, J.C., Estes, D.M., 2011b. Tuberculosis immunity: opportunities from studies with cattle. *Clin Dev Immunol* 2011, 768542.
- Waters, W.R., Palmer, M.V., Thacker, T.C., Payeur, J.B., Harris, N.B., Minion, F.C., Greenwald, R., Esfandiari, J., Andersen, P., McNair, J., Pollock, J.M., Lyashchenko, K.P., 2006. Immune responses to defined antigens of

## Bibliografía

- Mycobacterium bovis* in cattle experimentally infected with *Mycobacterium kansasii*. Clin Vaccine Immunol 13, 611-619.
- Waters, W.R., Palmer, M.V., Whipple, D.L., Carlson, M.P., Nonnecke, B.J., 2003. Diagnostic implications of antigen-induced gamma interferon, nitric oxide, and tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. Clin Diagn Lab Immunol 10, 960-966.
- Waters, W.R., Thacker, T.C., Nonnecke, B.J., Palmer, M.V., Schiller, I., Oesch, B., Vordermeier, H.M., Silva, E., Estes, D.M., 2012. Evaluation of gamma interferon (IFN-gamma)-induced protein 10 responses for detection of cattle infected with *Mycobacterium bovis*: comparisons to IFN-gamma responses. Clin Vaccine Immunol 19, 346-351.
- Waters, W.R., Vordermeier, H.M., Rhodes, S., Khatri, B., Palmer, M.V., Maggioli, M.F., Thacker, T.C., Nelson, J.T., Thomsen, B.V., Robbe-Austerman, S., Bravo Garcia, D.M., Schoenbaum, M.A., Camacho, M.S., Ray, J.S., Esfandiari, J., Lambotte, P., Greenwald, R., Grandison, A., Sikar-Gang, A., Lyashchenko, K.P., 2017. Potential for rapid antibody detection to identify tuberculous cattle with non-reactive tuberculin skin test results. BMC Vet Res 13, 164.
- Wayne, L.G., 1982. Microbiology of tubercle bacilli. Am Rev Respir Dis 125, 31-41.
- Whelan, C., Shuralev, E., O'Keeffe, G., Hyland, P., Kwok, H.F., Snoddy, P., O'Brien, A., Connolly, M., Quinn, P., Groll, M., Watterson, T., Call, S., Kenny, K., Duignan, A., Hamilton, M.J., Buddle, B.M., Johnston, J.A., Davis, W.C., Olwill, S.A., Clarke, J., 2008. Multiplex immunoassay for serological diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Clin Vaccine Immunol 15, 1834-1838.
- Wiker, H.G., 2009. MPB70 and MPB83--major antigens of *Mycobacterium bovis*. Scand J Immunol 69, 492-499.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L., 1996. Progress with proteome projects:

why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13, 19-50.

Wobeser, G., 2009. Bovine tuberculosis in Canadian wildlife: an updated history. *Can Vet J* 50, 1169-1176.

Wood, P.R., Corner, L.A., Plackett, P., 1990. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Res Vet Sci* 49, 46-49.

Wood, P.R., Jones, S.L., 2001. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 81, 147-155.

Wu, H.J., Wang, A.H., Jennings, M.P., 2008. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Curr Opin Chem Biol* 12, 93-101.

Xiong, X., Wang, X., Wen, B., Graves, S., Stenos, J., 2012. Potential serodiagnostic markers for Q fever identified in *Coxiella burnetii* by immunoproteomic and protein microarray approaches. *BMC Microbiol* 12, 35.

Xu, G., Li, Y., Yang, J., Zhou, X., Yin, X., Liu, M., Zhao, D., 2007. Effect of recombinant Mce4A protein of *Mycobacterium bovis* on expression of TNF- $\alpha$ , iNOS, IL-6, and IL-12 in bovine alveolar macrophages. *Mol Cell Biochem* 302, 1-7.

Yang, H., Kruh-Garcia, N.A., Dobos, K.M., 2012. Purified protein derivatives of tuberculin--past, present, and future. *FEMS Immunol Med Microbiol* 66, 273-280.

Young, D., Roman, E., Moreno, C., O'Brien, R., Born, W., 1993. Molecular chaperones and the immune response. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 339, 363-367; discussion 367-368.

Yuan, R.R., Casadevall, A., Oh, J., Scharff, M.D., 1997. T cells cooperate with passive antibody to modify *Cryptococcus neoformans* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2483-2488.

## Bibliografía

- Zanardi, G., Boniotti, M.B., Gaffuri, A., Casto, B., Zanoni, M., Pacciarini, M.L., 2013. Tuberculosis transmission by *Mycobacterium bovis* in a mixed cattle and goat herd. *Res Vet Sci* 95, 430-433.
- Zanolari, P., Robert, N., Lyashchenko, K.P., Pfyffer, G.E., Greenwald, R., Esfandiari, J., Meylan, M., 2009. Tuberculosis caused by *Mycobacterium microti* in South American camelids. *J Vet Intern Med* 23, 1266-1272.
- Zeng, J.C., Xiang, W.Y., Lin, D.Z., Zhang, J.A., Liu, G.B., Kong, B., Gao, Y.C., Lu, Y.B., Wu, X.J., Yi, L.L., Zhong, J.X., Xu, J.F., 2015. Elevated HMGB1-related interleukin-6 is associated with dynamic responses of monocytes in patients with active pulmonary tuberculosis. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 1341-1353.
- Zhang, C.G., Chromy, B.A., McCutchen-Maloney, S.L., 2005. Host-pathogen interactions: a proteomic view. *Expert Rev Proteomics* 2, 187-202.
- Zhu, W., Smith, J.W., Huang, C.M., 2010. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol* 2010, 840518.
- Zimmermann, N., Thormann, V., Hu, B., Kohler, A.B., Imai-Matsushima, A., Locht, C., Arnett, E., Schlesinger, L.S., Zoller, T., Schurmann, M., Kaufmann, S.H., Wardemann, H., 2016. Human isotype-dependent inhibitory antibody responses against *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO Mol Med* 8, 1325-1339.
- Zou, K.H., O'Malley, A.J., Mauri, L., 2007. Receiver-operating characteristic analysis for evaluating diagnostic tests and predictive models. *Circulation* 115, 654-657.

## **8. Anexos**



## 8. ANEXOS

### Anexo I. Listado de reactivos y equipos utilizados.

#### 1. Material biológico

- Ratones BALB/c (animalario del ISCIII, Majadahonda)
- Línea celular de mieloma de ratón SP2/O-Ag14, ATCC (Middlesex, UK)

#### 2. Reactivos:

- Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 3 N (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania)
- Adyuvante incompleto Freund (AIF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Albúmina sérica bovina (BSA), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Anticuerpo policlonal de cabra frente a inmunoglobulinas de ratón marcado con peroxidasa (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)
- Anticuerpo policlonal de conejo frente a inmunoglobulinas de oveja marcado con peroxidasa (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)
- Anticuerpo policlonal de conejo frente a inmunoglobulinas de bovinos marcado con peroxidasa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Anticuerpo policlonal de conejo frente a inmunoglobulinas porcinas marcado con peroxidasa (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA)
- Anticuerpo policlonal de conejo frente a inmunoglobulinas de llamas marcado con peroxidasa (Invitrogen, Massachusetts, USA)
- Anticuerpo monoclonal frente a inmunoglobulinas de tejón marcado con peroxidasa (Goodger et al., 1994)
- Antisero policlonal de cabra monoespecífico para los isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 y las cadenas  $\kappa$  y  $\lambda$  de ratón (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)
- Columnas HiTrap™ Protein G HP (GE Healthcare Life-Sciences, Chicago, Illinois, USA)



- Columns HiTrap™ NHS-activated HP (GE Healthcare Life-Sciences Chicago, Illinois, USA)
- Aminopterina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- Diaminobencidina (DAB) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Estreptavidina marcada con peroxidasa (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)
- Medio Clonacell HY (Stemcell, Grenoble, Francia)
- Medio RPMI 1640 (Lonza, Vervies, Bélgica)
- Membranas de Nitrocelulosa, (Amersham™ Protran™ 0,45 µm NC (GE Healthcare Life-Sciences, Chicago, Illinois, USA)
- O-fenilendiamina (OPD) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Polietilenglicol, Hybri-max (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Reactivos de SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ez-link-Sulfo-NH-LC-Biotina (Thermo Scientific, Schaumburg, IL, USA)
- Tampón fosfato salino (PBS) (Lonza, Vervies, Bélgica)
- Dihidrocloreto de o-fenilendiamina (FAST OPD, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Placas ELISA de 96 pocillos, Maxisorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca)
- Tripsina de grado proteómico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- RNasa libre de DNase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- DNasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Solución MALDI: 30% ACN/15% isopropanol/0.5% TFA
- Solución matriz (3 mg/mL ácido α-Cyano-4-hidroxibenzóico en solución MALDI)
- Kit de cuantificación de proteína Pierce a 660 nm (ThermoFisher Scientific, MA, USA)
- StageTip C18 (ThermoFisher Scientific, MA, USA).
- Peróxido de hidrógeno al 33% p/v (PanReac AppliChem, Spain).
- PBS suplementado con 0,05% de Tween 20 (PBST)
- Sensor Chip CM5 (GE Healthcare Life-Sciences, Chicago, Illinois, USA).

## 2. Equipos:

- Citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, NY, USA)

- Espectrofotómetro ANTHOS 2020 (Cultek S.L.U, Madrid)
- Espectrofotómetro SmartSpec™ Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Proteineer DP (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)
- Espectrómetro de masas ABI 4800 MALDI TOF / TOF (AB SCIEX, Foster City, CA)
- Placas de MALDI-TOF de 384 pocillos OptiTOFTM Plate (AB SCIEX, Foster City, CA)
- Eksigent nanoLC Ultra 1D plus (AB SCIEX) acoplado a un espectrómetro de masas 5600 Triple TOF® (AB SCIEX) equipado con una fuente Nanospray III.
- Columna de fase reversa Waters Acquity UPLC M-Class Peptide BEH C18 (75 µm x 150 mm, partículas de 1,7 µm, 130 Å de poro).
- Columna de exclusión molecular Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare Life-Sciences, Chicago, Illinois, USA)
- Sistemas de cromatografía de presión media BioLogic DuoFlow (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Biacore X100 (GE Healthcare Life-Sciences, Chicago, Illinois, USA)



## Anexo II. Aportaciones científicas derivados del trabajo realizado para la presente tesis doctoral

Fruto de los estudios desarrollados para realizar la presente tesis doctoral, se han publicado los siguientes trabajos:

### Artículos científicos internacionales:

- Cardoso-Toset F., Luque I., Carrasco L., Jurado-Martos F., Risalde MA., Venteo A., **Infantes-Lorenzo JA.**, Bezos J., Rueda P., Tapia I., Gortazar C., Dominguez L., Dominguez M. y Gomez-Laguna J. Evaluation of five serologic assays for bovine tuberculosis surveillance in domestic free-range pigs from southern Spain. Preventive Veterinary Medicine. 137(2017):101-104. 2017. (A). ISSN: 0167-5877. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2016.12.016
- Casal C., **Infantes-Lorenzo JA.**, Risalde MA., Diez-Guerrier A., Dominguez M., Moreno I., Romero B., de Juan L., Saez JL., Juste R., Gortazar C., Dominguez L. y Bezos J. Antibody detection tests improve the sensitivity of tuberculosis diagnosis in cattle. Research in Veterinary Science. 112(2017):214-221. 2017. (A). ISSN: 0034-5288. DOI: 10.1016/j.rvsc.2017.05.012
- **Infantes-Lorenzo JA.**, Moreno I., Risalde MA., Roy A., Villar M., Romero B., Ibarrola N., de la Fuente J., Puentes E., de Juan L., Gortazar C., Bezos J., Dominguez L. y Dominguez M. Proteomic characterisation of bovine and avian purified protein derivatives and identification of specific antigens for serodiagnosis of bovine tuberculosis. Clinical Proteomics. (2017):1-10. 2017. (A). ISSN: 1542-6416. DOI: 10.1186/s12014-017-9171-z
- Cano-Terriza D., Risalde MA., Jiménez-Ruiz S., Vicente J., Isla J., Paniagua J., Moreno I., Gortazar C., **Infantes-Lorenzo JA.** y García-Bocanegra I. Management of hunting waste as control measure for tuberculosis in wild ungulates in south-central Spain. Transboundary and Emerging Diseases. In Press. (A). ISSN: 1865-1674. DOI: 10.1111/tbed.12857

- Bezos J., Roy A., **Infantes-Lorenzo JA.**, Gonzalez I., Venteo A., Romero B., Grau A., Minguez O., Dominguez L. y de Juan L. The use of serological tests in combination with the intradermal tuberculin test maximizes the detection of tuberculosis infected goats. Veterinary Immunology and Immunopathology. 199(2018):43-52. 2018. (A). ISSN: 0165-2427. DOI: 10.1016/j.vetimm.2018.03.006
- Roy A., **Infantes-Lorenzo JA.**, Blazquez J., Venteo A., Mayoral-Alegre F., Dominguez M., Moreno I., Romero B., de Juan L., Grau A., Dominguez L. y Bezos J. Temporal analysis of the interference caused by paratuberculosis vaccination on the tuberculosis diagnostic tests in goats. Preventive Veterinary Medicine. 156(2018):68-75. 2018. (A). ISSN: 0167-5877. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2018.05.010
- **Infantes-Lorenzo JA.**, Whitehead CE., Moreno I., Bezos J., Roy A., Dominguez L., Dominguez M. y Salguero FJ. Development and Evaluation of a Serological Assay for the Diagnosis of Tuberculosis in Alpacas and Llamas. Frontiers in Veterinary Science. 5(2018):189. 2018. DOI: 10.3389/fvets.2018.00189

### Patente Europea:

- EP3330286 - METHODS AND COMPOSITIONS FOR TUBERCULOSIS DIAGNOSIS.

Y además, se encuentran en fase de revisión o preparación manuscritos sobre los siguientes estudios:

- Thomas J., **Infantes-Lorenzo JA.**, Moreno I., Romero B., Garrido J., Juste R., Dominguez L., Dominguez M., Gortazar C., Risalde MA. A new test to detect antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* complex in red deer serum. Revisiones menores en The Veterinary Journal.
- Thomas J., **Infantes-Lorenzo JA.**, Moreno I., Cano-Terriza D., de Juan L., García-Bocanegra I., Dominguez L., Dominguez M., Gortázar C., Risalde MA. Validation of a new serological assay for the identification

of *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific antibodies in pigs and wild boar. Revisiónes mayores en Preventive Veterinary Medicine.

- **Infantes-Lorenzo JA**, Dave D., Moreno I., Anderson P., Lesellier S., Gormley E., Dominguez L., Balseiro A., Gortázar C., Dominguez M., Salguero FJ. New serological platform for detecting antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* complex in European badgers. Revisiónes mayores en Veterinary Medicine and Science.
- Evaluation of specificity of an ELISA to detect specific antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* complex in different species. En preparación.
- Immunoproteomic analysis of protein purified derivate of *Mycobacterium bovis*, a promising diagnostic biomarker for serological and immunohistochemical detection of tuberculosis infection. En preparación.
- Use of monoclonal antibodies to describe proteins of aPPD, paratuberculosis vaccine and *Corynebacterium pseudotuberculosis* that may interfere in the diagnosis of bovine tuberculosis. En preparación.
- Tuberculosis outbreak in camels and dromedaries- A case report. En preparación.

#### Participaciones en congresos:

- Cardoso-Toset F., Luque I., Carrasco L., Rialde M.A., Venteo A., **Infantes-Lorenzo J.A.**, Rueda P., Gortázar C., Domínguez L., Domínguez M., Gómez-Laguna J. Evaluation of four ELISA assays to diagnose *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in pigs. *24th International Pig Veterinary Society Congress (IPVS 2016) and 8th European Symposium of Porcine Health Management (ESPHM 2016)*. Dublin, Irlanda. **2016**. (Póster)

- Cano-Terriza D, de los Angeles Riscalde M, Gortazar C, **Infantes-Lorenzo JA**, Dominguez L, Dominguez M, Vicente J, Napp S, Allepuz A, Jimenez-Ruiz S, Paniagua J and Garcia-Bocanegra I. Estudio comparativo de la prevalencia de tuberculosis bovina en suidos domésticos y silvestres en el sur de España. *34èmes rencontres du G.E.E.F.S.M. Laruns, Francia. 2016* (Comunicación oral).
- Cano-Terriza D, Riscalde MA, Jimenez-Ruiz S, Vicente J, Isla J, Paniagua J, **Infantes-Lorenzo JA**, Romero B, Dominguez M, Gortazar C, Dominguez L and Garcia-Bocanegra I. Evaluación de la gestión de subproductos no destinados al consumo humano en la práctica cinegética de caza mayor como medida de control de la tuberculosis bovina en ungulados silvestres en España. *35º Encuentro del Grupo de Estudio de Ecopatología de la Fauna Silvestre de Montaña (GEEFSM). Cofrentes, España. 2017.* (Comunicación oral).
- **Infantes-Lorenzo JA**, Moreno I, Riscalde MA, Bezos J, de Juan L, Dominguez L and Dominguez M. Proteomic characterisation of bovine and avian purified protein derivatives. *Med-Vet-Net Association 5th International Scientific Conference (OneHealth: Zoonoses - Emerging Threats). Guildford, Reino Unido. 2017.* (Póster).
- Thomas J, **Infantes-Lorenzo JA**, Gortazar C, Moreno I, Romero B, Cano-Terriza D, Roy A, Garcia-Bocanegra I, Juste R, Dominguez M, Dominguez L and Riscalde MA. Validación de una nueva prueba serodiagnóstica para la medición de anticuerpos anti-complejo Mycobacterium tuberculosis en ungulados silvestres: ciervo y jabalí. *XXII Simposio AVEDILA. 2017* (Comunicación oral).
- Thomas J., **Infantes-Lorenzo JA**., Gortazar C., Moreno I., Romero B., Cano-Terriza D., Roy A., Garcia-Bocanegra I., Juste R., Dominguez M., Dominguez L. y Riscalde MA.. Validación de una nueva prueba serodiagnóstica para la medición de anticuerpos anti-complejo Mycobacterium tuberculosis en ungulados silvestres: ciervo y jabalí. *XXII Simposio AVEDILA. Valladolid, España. 2017.* (Comunicación oral)

- Bezos J., Roy A., **Infantes-Lorenzo JA.**, Dominguez M., Romero B., Venteo A., Grau A., Minguez O., Dominguez L. y de Juan L. Rendimiento de las técnicas serológicas para el diagnóstico de la tuberculosis caprina en un rebaño recientemente infectado y de alta prevalencia. *XXII Simposio AVEDILA*. Valladolid, España. **2017**. (Comunicación oral)
- Cano-Terriza D, Riscalde MA, Isla J, Moreno I, **Infantes-Lorenzo JA**, Valdez MJ and Garcia-Bocanegra I. Estudio seroepidemiológico de la tuberculosis en el porcino extensivo en Andalucía. *XXII Simposio AVEDILA*. Valladolid, España. **2017**. (Comunicación oral).
- Roy A, **Infantes-Lorenzo JA**, Blazquez JC, Puente E, Venteo A, Mayoral-Alegre F, Moreno I, Pozo P, Lozano F, Vinolo C, Romero B, de Juan L and Bezos J. Evolución temporal de la interferencia ocasionada por la vacunación frente a paratuberculosis con las pruebas inmunológicas empleadas en el diagnóstico de la tuberculosis caprina. *XXII Simposio AVEDILA*. Valladolid, España. **2017** (Comunicación oral).